

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Kristiina Tüür

Soikeseisundist väljumine ja seda mõjutavad tegurid
Escherichia coli's

Bakalaureusetöö

Juhendaja teadur Arvi Jõers

TARTU 2013

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Bakterite paljunemisviisid.....	6
1.2 Bakterikultuuri kasvufaasid.....	7
1.3 Soikeseisund.....	9
1.3.1 Endosporid	10
1.3.2 VBNC seisund.....	11
1.3.3 Persisterid	12
1.4 Fenotüübiline mitmekesisus	13
1.5 Biofilmid	14
1.6 Soikeseisundist väljumine	14
1.6.1 Spooride idanemine.....	15
1.6.2 Väljumine VBNC seisundist	17
1.6.3 Persisterite aktiveerumine	18
1.6.4 Aktiveerumine pärast statsionaarset faasi	20
2. EKSPERIMENTAALOSA	23
2.1. Töö eesmärgid	23
2.2. Materjal ja meetodika.....	24
2.2.1 Bakteritüved, söötmed, plasmiidid.....	24
2.2.2 Katsete formaat	24
2.2.3 Läbivoolutsütomeetria.....	25
2.2.4 Söötme konditsioneerimine.....	25
2.2.5 Eksperimendid ampitsilliiniga.....	27
2.2.6 Söötme ekstraktsioon etüülatsetaadiga.....	27
2.2.7 Söötme fraktsioneerimine C-18 pöördfaasikolonniga.....	27
2.3. Tulemused	29
2.3.1 Statsionaarsest faasist väljumisel võib bakterirakkude metaboolne aktiveerumine olla heterogeenne	30
2.3.2 Metaboolselt aktiveerunud rakud stimuleerivad statsionaarses faasis rakkude aktiveerumist	31
2.3.3 Varem aktiveerunud rakud mõjutavad hilisemaid ärkajaid sekreteeritava faktori, faktor X-i kaudu	32
2.3.4 Konditsioneeritud sööde säilitab aktiivsuse ka külmutamisel.....	34
2.3.5 Faktor X'i puhastamine konditsioneeritud söötmest.....	35
2.4. Arutelu.....	39
KOKKUVÕTE.....	43

SUMMARY	44
KIRJANDUSE LOETELU	45
LIHTLITSENTS	49

KASUTATUD LÜHENDID

Amp – ampitsilliin

g – suhteline tsentrifugaaljõud

GASP – kasvueelis statsionaarses faasis (*growth advantage in stationary phase*)

GFP – roheline fluorestseeruv valk (*green fluorescent protein*)

Glc – glükoos

Gly – glütserool

Glt – glükonaat

MOPS – 3-(N-morfoliino)propaansulfoonhape (*3-(N-morpholino)propanesulfonic acid*)

PBS – fosfaatpuhvriga soolalahus (*phosphate buffered saline*)

Rpf – kasvamahakkamist soodustav faktor (*Resuscitation promoting factor*)

rpm –pöördeid minuti kohta (*rotations per minute*)

VBNC – elus, kuid mittekultiveeritav (*viable but non-culturable*)

SISSEJUHATUS

Geneetiliselt identsetest rakkudest koosnevad mikroobipopulatsioonid sisaldavad tihti mitmesuguste fenotüüpidega rakke (Lidstrom ja Konopka, 2010). Erinevused rakkude füsioloogias võivad osutada kasulikeks oludes, kui keskkond muutub nii järsult, et tavapäraste kaitsemehhanismidega seda kompenseerida ei saa. Fenotüübiline heterogeensus tõstab tõenäosust, et populatsioon elab üle olud, kus stressivastuse indutseerimine liiga kaua aega võtaks. Üks fenotüübilise heterogeensususe vorme on persistentsus – bakterite võime elada mittegeneetiliste mehhanismide abil üle kokkupuude antibiootikumidega ja hiljem kasvamist jätkata. Seeläbi etendab bakterikultuuride loomupärane fenotüübiline mitmekesisus olulist rolli bakteriaalsete infektsioonide pikaajalisel püsimisel ja kordumisel (Bigger, 1944; Lewis, 2008).

Bakteriaalsete infektsioonide raviks kasutatakse antibiootikume, mis on teatud mikroorganismidele surmavalt või paljunemist peatavalt mõjuvad ained. Enamasti toimivad nad läbi mikroobi elutähtsate protsesside inhibeerimise, mistõttu on nende mõju aktiivselt kasvavatele ja jagunevatele rakkudele oluliselt suurem kui soikeseisundis rakkudele. Soikeseisundis bakterid ei jagune ning nende metabolism on vegetatiivse rakuga võrreldes oluliselt aeglasem (Dworkin ja Shah, 2010). Mitmed autorid on arvanud, et keskkonnas leiduvad mikroobid viibivad valdva osa ajast soikunud olekus (Lewis, 2007). Mõnede bakteriliikide soikeseisund on vegetatiivsest rakust morfoloogiliselt selgesti eristatav, mõnede puhul nagu *E. coli* ei pruugi aga visuaalseid erinevusi tekkida (Dworkin ja Shah, 2010).

Käesoleva bakalaureusetöö teoreetilises osas käsitletakse bakterikultuuri kasvufaase ja antakse ülevaade bakterite soikeseisunditest. Kirjeldatakse põhjusi, miks erinevad bakteriliigid soikeseisunditesse sisenevad ja kuidas sealt välja juuavad ning selgitatakse metaboolselt aktiivsete rakkude rolli soikeseisundis rakkude aktiveerumisel.

Töö praktilises osas uuritakse, kuidas süsinikunälja tõttu statsionaarsesse faasi läinud *E. coli* rakud uuele süsinikuallikale reageerivad ja kirjeldatakse senitundmatut sekreteeritavat faktorit, mis stimuleerib soikeseisundis populatsiooni uuesti kasvama hakkama.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Bakterite paljunemisviisid

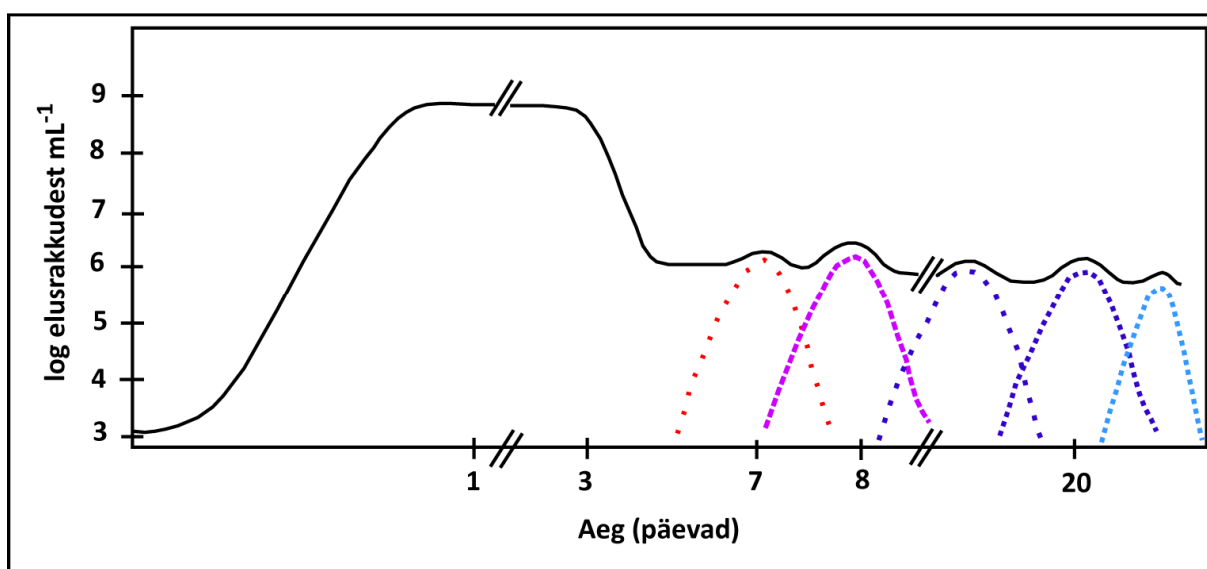
Kasvamine ja paljunemine on bakterifüsioloogia kõige põhjalikumalt uuritud valdkond. Baktered jagunevad pooldumise teel. Bakterirakk kasvab mõõtmelt, kromosoom ja plasmiidid replitseeruvad, kromosoomid liiguvad raku pooluste suunas, raku keskele tekib vahesein ning tütarrakud eralduvad üksteisest. Bakterite rakutsükkel ühest jagunemisest järgmiseni jagatakse kolme ossa: eristatakse B faasi raku sünnist kromosoomi replikatsiooni alguseni, C faasi, mille käigus replitseeritakse kromosoom, ning D faasi, mis jääb kromosoomi replitseerumise ja rakujagunemise vahele (Wang *et al.*, 2009). Need faasid võivad kiirelt kasvavates bakterites generatsiooniaja vähendamiseks ka kattuda (Wang *et al.*, 2009). Eksponentsiaalse kasvufaasi rakud poolduvad, kui nende mass on kahekordistunud. See tagab rakkude konstantse suuruse. (Wang *et al.*, 2009). Reduktiivse jagunemise korral toimub jagunemine enne massi kahekordistumist, mille tulemusena on tekkivad tütarrakud väiksemad kui vanemrakk. (Wang *et al.*, 2009). Reeglina on jagunemine võrdne ja tekib kaks suuruselt sarnast tütarrakku, kuid esineb ka erandjuhte, mille käigus moodustuvad rakud on erinevad kas suuruse, funktsiooni või metaboliitide sisalduse poolest. Näiteks *Caulobacter* on veebakter, kes kinnitub pindadele kinnitusjätke abil ning tema pooldumine on diferentseeriv: moodustub sessiilne, kinnitumisjätkega rakk ja liikuv, viburiga rakk (Wagner ja Brun, 2007). Ka *Bacillus subtilis* puhul tekib eksponentsiaalses kasvufaasis kaht tüüpi rakke: üksikud või kahekaupa paardunud liikumisvõimelised bakterid ning pinnale kinnitunud rakuketid (Kearns ja Losick, 2005). *Escherichia coli*, keda selles töös pikemalt käsitletakse, on klassikaline mudelorganism, Gram-negatiivne pulgakujuline bakter, kes paljuneb pooldumise teel ning eluneb soojavereliste loomade soolestikus.

Lisaks pooldumisele esineb eeltuumsete hulgas mitmesuguseid vähemlevinud paljunemisviise, kuid üheks huvitavamaks näiteks on paljunemine sporulatsiooni erivormide kaudu. Kui harilikult tekib sporogeensetes bakterites ühe raku kohta üks endospor, siis *Metabacterium polyspora* emarakus võib tekkida kuni üheksa spoori, mis emaraku lüüsumisel vabanevad (Ward *et al.*, 2008). *Epulopiscium fischelsoni* puhul (üks suuremaid baktereid) võib ühes isendis kasvada aga kuni seitse metaboolselt aktiivset tütarrakku, kes väljumisel samuti emaraku hävitavad (Angert *et al.*, 2004).

1.2 Bakterikultuuri kasvufaasid

Mikroobipopulatsiooni kasvu suletud kultuuris kirjeldab kasvukõver, millel on järgmised faasid: stardi- ehk lag-, eksponentsiaalne, statsionaarne, surma- ja hiline statsionaarne faas (joonis 1). Harvadel juhtudel võib kasv olla ka lineaarne, näiteks *Caulobacter*'i puhul, kuna pooldub vaid sessiilne rakk, motiilses vormis veedab bakter umbes 1/3 rakutsüklist (Wagner ja Brun, 2007).

Lag- ehk stardifaasis kohanevad mikroobirakud uue keskkonnaga. Suureneb rakkude DNA-, RNA- ja valkudesisaldus ning kasvab rakkude maht. Eksponentsiaalses kasvufaasis jagunevad rakud ühtlase kiirusega. Eksponentsiaalset kasvufaasi loetakse alanuks juba enne regulaarse jagunemise algust, kuna enamasti hinnatakse vedelkultuuride kasvu spektrofotomeetri abil. Lugemiks olev optiline tihedus annab vedelikus oleva biomassi, mitte rakkude hulga ning biomassi logaritmiline kasv algab juba varem kui rakkude logaritmiline jagunemine.



Joonis 1. Bakterikultuuri kasvufaasid. 37°C juures rikkas aereeritud vedelsöötmes kasvanud *Escherichia coli* rakud. 1 – lag- ehk stardifaas, 2 – eksponentsiaalne faas, 3 – statsionaarne faas, 4 – surmefaas, 5 – hiline statsionaarne faas. Katkendjooned märgivad erinevate mutantide pidevat kasvu ja domineerimist – GASP-tsükleid. X-teljel on aeg päevades, y-teljel logaritm elusrakkude arvukusest milliliitris. (Navarro Llorens *et al.*, 2010)

Eksponentsiaalses faasis on populatsiooni kasvukõveral võrdeline sõltuvus rakkude arvu logaritmi ja aja vahel, mis võimaldab määrata kultuuri kasvukiirust ja generatsiooniaega. Eksponentsiaalse kasvufaasi rakud on küllaltki standardsed - geneetiliselt on nad identsed, küll aga varieerub rakujagunemisel emarakust kaasa saadud regulaatormolekulide ja organellide hulk, mistõttu võib rakkude fenotüüp erineda (Eldar, 2010).

Kui suletud bakterikultuuris langeb toitainete kontsentratsioon ja kuhjuvad jääained, muutub ebasoodsaks pH, temperatuur või mõni muu keskkonnatingimus, siis pidurdub mikroobide kasv ning kultuur siseneb statsionaarsesse faasi. Mõnel juhul on võimalik eristada eksponentsiaalse ja statsionaarse faasi vahel ka kasvu aeglustumise faasi, teinekord (sõltuvalt söötimest) võib see üleminek olla küllalt järsk (Luidalepp, 2012). Statsionaarses faasis rakkude jagunemist enam ei toimu ning rakkude hulk stabiliseerub (Roostalu *et al.*, 2008). Looduslikes tingimustes elavatele bakteritele jagub enamasti kasvuks piisavalt toitaineid vaid piiratud aja jooksul, mistõttu on nende kasv üldjuhul limiteeritud ning rakkude väga aeglane paljunemine või viibimine statsionaarses faasis on pigem reegel kui erand (Finkel, 2006). Statsionaarsesse faasi üleminekul muutub oluliselt rakkude füsioloogia, nad võivad sõltuvalt liigist hakata tootma sekundaarseid metaboliite nagu antibiootikumid, bakteriotsiinid või hulgatunnetuse (*quorum sensing*) molekulid, muutuda transformatsioonikompetentseteks või sporuleeruda (Finkel, 2006). Statsionaarsesse faasi jõudes toimuvad ulatuslikud muutused bakterite geeniregulatsioonis. Ligi 10% *E. coli* geenidest on kas otseselt või kaudselt reguleeritud statsionaarse faasi sigmafaktori σ^S poolt (Navarro Llorens *et al.*, 2010). Statsionaarsesse faasi üleminekul pakseneb peptidoglükaanikiht, väheneb sisemembraani voolavus, taandava jagunemise teel väheneb raku pindala-ruumala suhe, kromosoom kondenseerub ning assambleeritakse ribosoomide kaksikkompleksid (Navarro Llorens *et al.*, 2010).

Statsionaarse faasi rakud elavad varuainete arvel ning säilitavad mõne aja potentsiaali paljuneda, seejärel hakkab elusrakkude arvukus populatsioonis langema - kultuur siseneb surmafaasi. Selle käigus 90-99% rakke hukkub ning kultuuri rakkude arvukus stabiliseerub teatud tasemele, näiteks LB-söötmes langeb *Escherichia coli* rakkude arvukus 10^9 CFU/ml-t 10^7 CFU/ml-le (Navarro Llorens *et al.*, 2010). Järgnevat faasi nimetatakse hiliseks statsionaarseks faasiks, mis erinevalt surmafaasieelsest statsionaarsest faasist on dünaamiline – rakud nii paljunevad kui ka surevad, samas püsib kultuuri üldine elulemus enam vähem stabiilsena. Hilises statsionaarses faasis saavad ülekaalu bakterid, millel on mõne juhusliku mutatsiooni tõttu kasvueelise just toitainevaestes tingimustes. Selliseid mutante nimetatakse GASP ehk *growth advantage in stationary phase* fenotüübiga mutantideks ning neid on võimalik LB-söötmes jälgida alates *E. coli* kultuuri kümnendast kasvupäevast (Finkel, 2006; Navarro Llorens *et al.*, 2010). Erinevaid mutante tekib pidevalt juurde ja kui mõni neist osutub teistest kohasemaks, tõrjub ta vanempopulatsiooni välja ja võtab seniks kultuuri üle, kui tuleb järgmine, kohasema mutatsiooniga alampopulatsioon (Navarro Llorens *et al.*, 2010). Sellist vaheldumist on kujutatud ka joonisel 1, kasvufaasis 5, kus erinevad punktiirjooned

tähistavad erinevate GASP mutatsioonidega alampopulatsioonide osakaalu antud kultuuris (Navarro Llorens *et al.*, 2010). GASP mutatsioone võib esineda mitmetes erinevates geenides olenevalt kasvutingimustest, rikka aereeritud söötme puhul enamasti siiski *rpoS* alleelis, mis kodeerib statsionarse faasi sigmafaktorit σ^S . Mutatsioon selles alleelis tingib selle sigmafaktori funktsiooni osalise kao. GASP fenotüüpi tekitavad mutatsioonid võivad esineda veel *sgaA*, *sgaB* ja *sgaC* geenides, mis võimaldavad mutantidel paremini surnud rakkudest keskkonda sattunud aminohappeid süsinikuallikana kasutada (Finkel, 2006; Navarro Llorens *et al.*, 2010). Arvatakse, et GASP mutatsioonid tekivad muude mutatsioonide hulgas, mis mismatch-reparatsioonisüsteemi (MMR) ja vigadealtite polümeraaside DNAPol IV ja V töö käigus ette tulevad. Kuna statsionaarses faasis on mõlemad DNA ahelad metüleeritud, et ole MMR süsteem vigastuste korral suuteline määrama, kumba ahelat parandada tuleb, mis omakorda tõstab tekkinud mutatsiooni säilimise tõenäosust (Finkel, 2006.). DNA kahjustuste korral indutseeritavad alternatiivsed DNA polümeraasid IV ja V võimaldavad küll jätkata DNA replikatsiooni kahjustatud kohtadest, ent lülitavad sünteesitava ahelasse vale nukleotiidi oluliselt sagedamini kui DNA polümeraas III. (Finkel, 2006.)

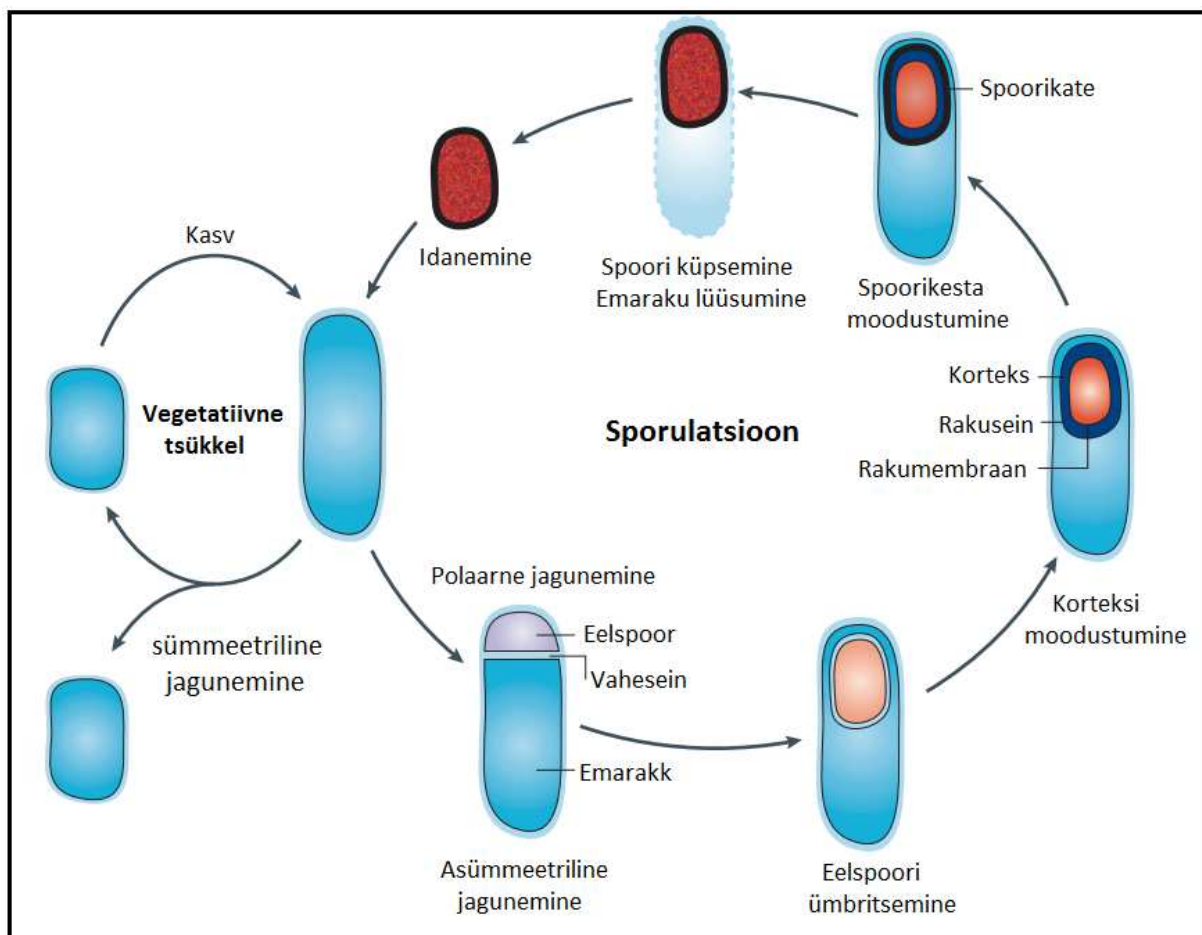
1.3 Soikeseisund

Vastusena mitmesugustele potentsiaalselt eluohtlikele muutustele kasvukeskkonnas võivad bakterid siseneda soikeseisundisse (*dormancy*), mis võimaldab neil pikka aega ebasoodsaid tingimusi taluda. Soikeseisundiks nimetatakse pöörduvat seisundit, mille kestel on eluvõimelise bioloogilise ühiku metaboolne aktiivsus madal (Keep *et al.*, 2006). Soikeseisund võib baktereid kaitsta näiteks nälja, kuivuse, ekstreemsete temperatuuride, UV-kiirguse või kas peremeesorganismi või konkureerivate mikroobide poolt keskkonda eritatud toksiliste ühendite eest (Dworkin ja Shah, 2010). Soikeseisundis bakterid ei jagune ning nende metabolism on vegetatiivse rakuga võrreldes oluliselt aeglasem või laboris detekteerimatu, viimasel juhul on tegu täieliku soikeseisundiga (Dworkin ja Shah, 2010). Mõnede bakteriliikide soikeseisund on vegetatiivsest rakust morfoloogiliselt selgesti eristatav, mõnede puhul ei pruugi aga visuaalseid erinevusi tekkida (Dworkin ja Shah, 2010).

Soikunud rakud võivad olla levisteks uutesse elupaikadesse jõudmisel ja nende hõivamisel, mängides suurt rolli ka patogeneesis. Kui immuunsüsteemil soikeseisundis baktereid elimineerida ei õnnestu, jäävad nad haiguskohteks, põhjustades korduvaid infektsioone ning kroonilisi haigusi. Samuti on soikeseisundis patogeenid probleemiks toiduainetööstuses, näiteks botulismitekitaja *Clostridium botulinum*'i spooride säilumine ja idanemine konservides (Dworkin ja Shah, 2010; Errington, 2003).

1.3.1 Endosporiid

Üheks põhjalikult uuritud soikeseisundi vormiks on endosporiid, mis on kuivuse, UV-kiirguse, toksiliste kemikaalide ning temperatuurikõikumiste suhtes väga vastupidavad ja võivad säilitada idanemisvõime aastamiljoniteks (Vreeland, 2000). Tuntud sporogeensed bakterid on näiteks *Bacillus* spp. ja *Clostridium* spp. Sporuleerumine on aeganõudev ja energiakulukas protsess ning valik sporuleeruda on väga täpselt reguleeritud (Errington, 2003). Mullabakter *Bacillus subtilis*'el on näljaga toimetulekuks ka mitmeid teisi strateegiaid, näiteks kemotaksis, lüütiliste ensüümide sekreteerimine keskkonda, antibiootikumide sünteesimine ja sekretsioon vähendamaks toidukonkurentsi teiste bakterite poolt (Errington, 2003). Sporuleerumist peetakse viimaseks variandiks, mida rakendatakse siis, kui muudest abinõudest pole kasu (Errington, 2003). Reeglina moodustub ühe bakteriraku kohta üks metaboolselt inaktiivne endospor, millel on veevaene, dipikoliinhappe-, fosfoglutseraadi- ja kaltsiumirikas südamik, kus paiknevad ribosoomid ning SASP-valkudega seotud DNA, ja mis on ümbritsetud peptidoglükaanist korteksi ning valgurikka spoorikestaga (Dworkin ja Shah, 2010). Spooride teke on etapiviisiline protsess, mille igas staadiumis avalduvad kindlad geenid. *Bacillus subtilis*'e puhul vallandab sporuleerumise nälg koos suure populatsioonitihedusega. Esmalt moodustub sporulatsiooniseptum, rakus eristub kaks piirkonda, millest ühest saab spoor ja teisest emarakk (joonis 2). Tekib kahekihilise membraaniga ümbritsetud eelspor ning selle ümber moodustub korteks. Seejärel moodustub selle ümber paks kaitsev kest ja eelspor küpseb veevaseks endosporiks. Viimase etapina emarakk lüüsub ning spoor vabaneb (Errington, 2003). Sporuleeruvad bakterid eritavad kasvukeskkonda sporulatsiooni pärssivat valku SdpA, mis takistab teiste rakkude sporulatsiooni ja sporulatsiooni tapmisfaktorit SkfA mis lüüsib sama liiki baktereid, kes hetkel ei sporuleeru (Errington, 2003). Lüüsunud rakkudest vabanevad toitained kindlustavad selle, et sporuleeruvad rakud saavad sporulatsiooni lõpule viia (Errington, 2003).



Joonis 2. *Bacillus subtilis*'e sporulatsioonitsüklil. (Errington, 2003)

Mitmed rakusisesed parasiidid nagu *Chlamydia* spp. moodustavad metaboolselt mitteaktiivseid elementaarkehi ning *Borrelia burgdorferi* rakud ümarkehi ("round body") (Dworkin ja Shah, 2010), mis on samuti soikeseisundi vormideks.

1.3.2 VBNC seisund

Elus, ent kultiveerimatu seisund ("*viable but non-culturable*", lühendatult VBNC) on bakterirakkude olek, kus nad ei ole võimelised kasvama neis tingimustes, kus nad harilikult kultiveeritavad on (Oliver, 2005). Küll aga võivad sellised bakterid mõne aja pärast jälle metaboolselt aktiivseks muutuda ja jagunema hakata (Oliver, 2005). VBNC seisundit kutsuvad esile nälg, muutused osmooses rõhus ja hapniku kontsentratsioonis, valge valgus, toidule lisatavad säilitusained, raskemetallid või kasvuks sobimatu temperatuur (Oliver, 2010), aga ka pikaajaline statsionaarses faasis viibimine (Shleevea *et al.*, 2004). VBNC seisundis rakkudel on terve, rikkumata membraan ja membraanipotentsiaal (Oliver, 2005; Oliver, 2010). Oliver toob oma 2005. aasta töös välja, et ligi 60 bakteriliiki on võimelised VBNC seisundisse langema, kuid väheste puhul oli näidatud kultiveeritavuse taastumist. Antibiootikumid VBNC seisundis rakke ei tapa (Oliver, 2010). Selles osas, kas VBNC on

tõeline füsioloogiline seisund või peegeldab vaid piiratud arusaamu bakteritele vajalikest kasvutingimustest, jäävad teadlased siiski eriarvamustele (Dworkin ja Shah, 2010; Oliver, 2010). VBNC seisundis rakkudest rääkimisel on äärmiselt oluline pöörata tähelepanu katsesüsteemile, kus nad on detekteeritud.

1.3.3 Persisterid

Väike osa bakterite üldpopulatsioonist on metaboolselt inaktiivsed ka siis, kui tingimused on kasvuks soodsad (Lewis, 2008; Balaban *et al.*, 2004). Sellise käitumise eelis tuleb ilmsiks muutuvates keskkondades, tehes need rakud oluliselt vähem tundlikuks näiteks antibiootikumide suhtes, kuna antibiootikumid mõjutavad eeskätt metaboolselt aktiivseid rakke (Balaban *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1944, Luidalepp, 2012). Baktereid, kes elavad mittegeneetiliste mehanismide abil üle töötlemise bakteritsiidsete antibiootikumidega ja on võimelised jätkama kasvamist, kui antibiootikum on kasvukeskkonnast eemaldatud, nimetatakse persisteriteks (Luidalepp, 2012; Levin ja Rozen, 2006). Morfoloogiliselt pole persistereid võimalik vegetatiivsetest rakkudest eristada.

Kaks mõistet, resistentsus ja persistentsus, tähistavad mikroobi tundetust antibiootikumi vastu, kuid neil on oluline vahe. Resistentsus on püsiv vastupanuvõime antibiootikumi suhtes, mis võimaldab tal ka antibiootikumi juuresolekul kasvada. Resistentsus tekib geneetilise muutuse tõttu organismi pärilikkusaines ja pärandatakse ka järeltulevatele põlvedele. Persistentsus on fenotüübiline, ajutine nähtus, mis järglastele üle ei kandu: persistentsete rakkude järglaskond on mikroobivastasele ainele sama tundlik kui algne populatsioon (Balaban, 2004), persisterid ei kasva antibiootikumi juuresolekul. Persistentsuse asemel kasutatakse vahel ka mõistet fenotüübiline tolerantsus. (Jayaraman, 2008; Levin ja Rozen, 2006)

Persisteri mõiste võttis kasutusele 1944. aastal iiri teadlane Joseph Warwick Bigger peatselt pärast penitsilliini rakendamist meditsiinis, kui märkas, et väike osa *Staphylococcus pyogenes* var. *aureus*'e rakke elas üle penitsilliiniga töötlemise ja jätkas kasvamist, kui antibiootikum söötimest eemaldati (Bigger, 1944). Üllatuslikult osutus ellujäänud rakkude järglaskond penitsilliinile sama tundlikuks kui algne populatsioon (Bigger, 1944). Tegu ei olnud mutantidega, mida tõendab lisaks eelnevale ka asjaolu, et taoliste bakterite esinemissagedus on kaugelt suurem kui juhuslikest mutatsioonidest tulenev resistentsus olla võiks (Drake, 1991). Bigger viis läbi kolm erinevat eksperimenti, mis näitasid, et penitsilliin tapab ainult jagunevaid rakke. Selle põhjal järeldas ta, et persisterid jäävad ellu just seetõttu, et nad ei

jagune (Bigger, 1944). Olgugi et penitsilliini toimetehhanism tollal veel päris selge polnud, osutused Biggeri oletused õigeks ja kehtivad tänapäevani. On oluline silmas pidada, et persisterid on geneetiliselt homogeenises bakteripopulatsioonis tekkinud juba enne kokkupuudet antibiootikumiga, mitte selle tõttu (Balaban *et al.*, 2004). Oma 2004. aasta töös näitasid Balaban ja kolleegid kujukalt, et persisterite näol on tegu bakteritega, kes ei pooldunud juba antibiootikumitöötusele eelnevas soodsas kasvukeskkonnas. Selline bakterikultuuride loomupärane fenotüübiline mitmekesisus etendab suurt osa bakteriaalsete infektsioonide pikaajalisel püsimisel ja kordumisel (Bigger, 1944; Lewis, 2008).

1.4 Fenotüübiline mitmekesisus

Põhiliseks fenotüübilise mitmekesisuse tingijaks peetakse nii bakterites kui päristuumsetes rakkudes vältimatuid stohhastilisi kõikumisi rakule oluliste molekulaarsete komponentide hulka ja nende aktiivsustes. Kui varem peeti geeniekspressiooni "müra" pigem segavaks, mida rakud kindlasti minimeerida püüavad, siis viimasel ajal on hakatud tunnustama selle rolli raku peamistes funktsioonides. Geeniekspressiooni müra tulemusena võivad geneetiliselt identsed rakud üksteisest käitumiselt erineda isegi samades keskkonnatingimustes. Ühtlasi on sel roll evolutsiooniliste adaptatsioonide tekkes, kuna võimaldab geeniekspressiooni reguleerida viisil, mida täpselt reguleeritud ekspressioon ei lubaks, jättes ruumi juhuslikele muutustele. (Eldar ja Elowitz, 2010; Lewis, 2007)

Rakukomponentide ebaühtlase jaotumise tõttu kahe tütaraku vahel ei pruugi isogeensete rakkude fenotüüp juba algusest peale olla identne. Kui pärilikkusaine jaguneb alati täpselt pooleks, siis muude rakukomponentide sattumine tütarakkudesse on ligikaudne. Organellide või molekulide puhul, mida on rakus hulgaliselt, ei ole nende täpne jaotumine oluline, kuid madala koopiarvuga valkude ja mRNA-de jaotumine mängib tihti võtmerolli rakkude edasises metabolismis. Madala koopiarvuga valkudeks on eeskätt paljud olulised regulaatormolekulid, näiteks transkriptsioonifaktorid, mis mõjutavad tugevalt nende poolt reguleeritavate valkude taset. Transkriptsiooni initsieerimisel lülitatakse geen sisse – sünteesitakse mitu koopiat mRNA-d, millelt omakorda sünteesitakse valku. Harva sünteesitava mRNA süntees toimub stohhastiliste pursetena, mistõttu ei ole selle kontsentratsioon rakus kogu aeg ühtlane (Eldar ja Elowitz, 2010). See, et ühelt mRNA molekulilt sünteesib sama valku korraga palju ribosome, loob lisavõimaluse ebaühtluse võimendumiseks. Oluliseks ühtlustavaks faktoriks on aeg: kui valgu eluiga on pikem kui sünteesipursete vaheline periood, on valgu keskmine tase rakus üsna püsiv. Geeniekspressiooni tase on otseselt mõjutatud teistelt, eelnevatelt geenidelt pursetena

toodetud ja ajas ühtlustunud transkriptsioonifaktorite ja teiste oluliste molekulide hulgast rakus. See võib omakorda kaasa tuua mittegeneetilist pärilikkust. Olenevalt rakujagunemisel kaasa saadud biomolekulide hulgast on rakud algusest peale ebavõrdses olukorras, hoolimata geneetilisest identsusest. Sel moel võib geenide ekspressioon aeglaselt kõikuda üle põlvkondade, nii et bakterid justkui „mäletaks“, mis tingimustes nende eellasrakk elanud on. (Eldar ja Elowitz, 2010)

1.5 Biofilmid

Et uurida ja mõista bakterite käitumist, tuleb mõista, milline on nende elupaik väljaspool laborit. Kui laboris kasvatatakse baktereid tihti planktooniliste rakkudena vedelkultuuris, siis looduses elunevad bakterid enamasti pinnale kinnitunud, eksopolüsahhariidse limamaatriksiga kaetud struktureeritud mikroobikogumites ehk biofilmides (Jayaraman, 2008; Lewis, 2008). Looduses esineb harva mikroobide puhaskultuure ning naabrite ja ümbruskonna tajumine on bakterite jaoks väga oluline (Jayaraman, 2008; Lewis, 2007; Kaeberlein *et al.*, 2002). Biofilmina elamine pakub mikroobidele kaitset abiootiliste tegurite, vaenlaste ja immuunsüsteemi eest, tagab stabiilsema elukeskkonna ning pakub võimalust koloniseerida uusi ökonišše (Lewis, 2008). Näiteks kiire vooluga veekogudes uhutaks planktoonilised rakud minema, kuid pinnale kinnitunult on neil võimalus seal püsima jääda (Lewis, 2008). Hinnanguliselt on 65% arenenud maades esinevatest infektsioonidest seotud biofilmidega, kuna muidu antibiootikumide suhtes tundlikud rakud alluvad biofilmide koosseisus ravile oluliselt kehvemini (Lewis, 2007).

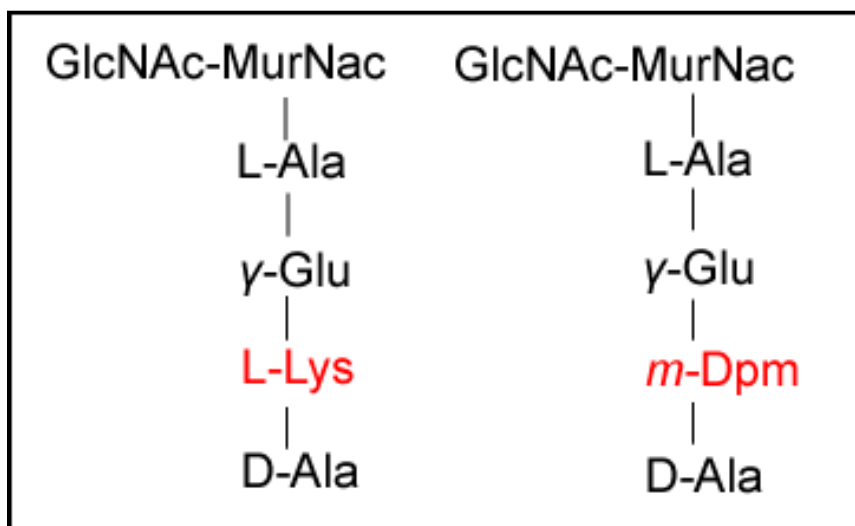
1.6 Soikeseisundist väljumine

Et soodsate olude ilmnemisel uuesti kasvama ja paljunema asuda, on soikeseisundis bakterite jaoks oluline õigel hetkel aktiveeruda (Shah *et al.*, 2008). Piiratud arusaamine bakterite loomulikus elukeskkonnas valitsevatest tingimustest on oluliseks takistuseks nii soikeseisundisse sisenemisel kui sellest väljumisel oluliste stiimulite ühesel tuvastamisel (Dworkin ja Shah, 2010). Soikeseisundist väljumine võib olla nii juhuslik ja täiesti sõltumatu rakuvälistest teguritest, mis on üheks võimalikuks variandiks persisterite puhul (Balaban *et al.*, 2004), kui ka keskkonnast sõltuv otsus nagu spooride idanemine (Shah *et al.*, 2008). Olgugi, et üheks väga oluliseks kasvutingimuseks on toitainete olemasolu, leidub mitmeid teisi tegureid, millega bakter arvestama peab. Lisaks soodsatele tingimustele tuleb ära tunda ka ebasoodsaid, näiteks antimikroobsete ühendite leidumine keskkonnas. Soikeolekus rakkude metaboolne aktiivsus on väga madal või puudub sootuks, seega peab olude

tunnetamine toimuma võimalikult ökonoomselt. Üheks selliseks viisiks on kindlaks teha, kas teised organismi looduslikule nišile omased bakterid antud keskkonnas elavad ja vastavalt sellele soikeolekust väljuda (Kaeberlein *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2008; Dworkin ja Shah, 2010).

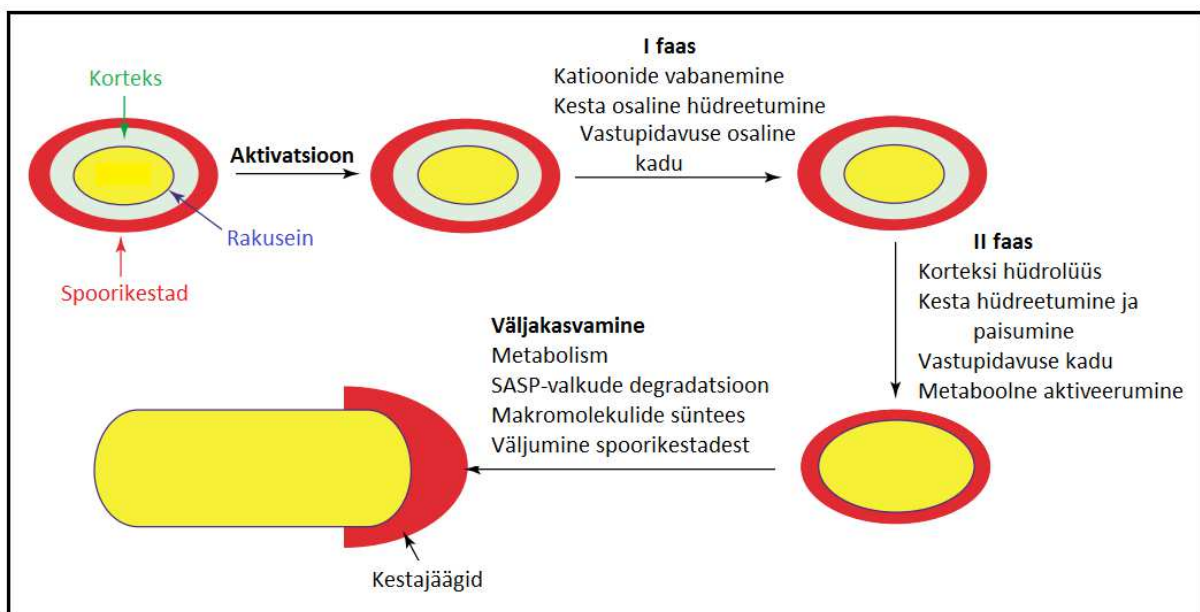
1.6.1 Spooride idanemine

Spoorid võivad idaneda vastusena keskkonnas leiduvatele toitainetele nagu aminohapped, suhkrud või puriini nukleosiidid, või nende kombinatsioonidele (Setlow, 2003). Lisaks toitainetele võivad idanemist indutseerida ka muud tegurid nagu suur rõhk, soolad, katioonsed surfaktandid, lüsoosüüm ja kaltsium-dipikolinaat (Setlow, 2003). Oma 2008. aasta töös näitavad Shah ja kolleegid, et *B. subtilis*'e spooride idanemist kutsuvad esile metaboolselt aktiivsete bakterite poolt keskkonda eritavad muropeptiidid, mis võivad pärineda nii teistelt sporogeensetelt kui Gram-negatiivsetelt bakteritelt. Bakterite rakusein moodustub peptidoglükaanist, mis koosneb vaheldumisi β -(1,4) sidemetega ühendatud N-atsetüülglükosamiini- ja N-atsetüülmuraamhappejääkidest. N-atsetüülmuraamhappejäägid on ühendatud lühikesete peptiididega, mida nimetatakse muropeptiidideks. Asporogeensete gram-positiivsete muropeptiidid erinevad sporogeensete Gram-positiivsete ja Gram-negatiivsete muropeptiididest ühe aminohappe võrra (joonis 3). See erinevus on piisav, et asporogeensete Gram-positiivsete muropeptiidid *B. subtilis*'e spooride idanemist esile ei kutsuks. (Shah *et al.*, 2008).



Joonis 3. Muropeptiidide võrdlus. Vasakpoolne muropeptiid, mille kolmandas positsioonis on L-Lüsiini jääk, on iseloomulik enamikele asporogeensetele Gram-positiivsetele bakteritele. Parempoolne muropeptiid, mille 3. positsioonis on meso-diaminopimeelhappejääk, on iseloomulik sporogeensete Gram-positiivsete ja Gram-negatiivsete bakterite rakukestale. (Shah *et al.*, 2008)

Kõige põhjalikumalt on spooride idanemise mehhanismi uuritud *Bacillus subtilis*'e näitel (joonis 4). Esmalt tõuseb spoorides H^+ ja Zn^{2+} tase ja spoorikesta pH tõuseb 6,5-lt 7,7-ni, võimaldamaks ensüümide tööd spoorikesta rehüdreerumisel. Seejärel vabaneb spoorikestast suur kogus dipikoliinhapet ja sellega seotud Ca^{2+} ioone. Dipikoliinhappe vahetab välja vesi ehk spoorikest hüdreerub, mistõttu väheneb spooride taluvus niiske kuumuse suhtes. Järgneb spoori peptidoglükaanist korteksi hüdrolüüs ning spoor paisub vee sisseimamise ja mikroobi rakuseina kasvu tõttu. Selle tulemusena on spoorikest piisavalt hüdreetunud, et võimaldada proteiinide liikumist ja ensümaatilist aktiivsust. Kõik eeltoodud protsessid kulgevad ilma detekteeritava metabolismita. Nende etappide järel aktiveerub raku metabolism, DNA-d stabiliseerinud SASP valgud lagundatakse, algab makromolekulide süntees ning rakk vabaneb spoorikestast (Setlow, 2003).



Joonis 4. Spooride idanemise mehhanism *B. subtilis*'e näitel. (Setlow, 2003)

Idanemise indutseerimisel seonduvad toitained spooride sisemembraanis paiknevatele retseptoritele, mis on *B. subtilis*'e puhul kodeeritud homologsete tritsistronsete *gerA*, *gerB* ja *gerK* operonide poolt (Paidhungat ja Setlow, 2000, Setlow, 2003). Sarnaseid Ger-A tüüpi valke leidub ka teistes *Bacillus*'e ja *Clostridium*'i liikides (Setlow, 2003). Antud retseptorite suhtes defektsed *B. subtilis*'e spoorid toitainete juuresolekul ei idane, kuid on võimelised idanema vastusena muropeptiididele (Shah *et al.*, 2008), lüsoosiümile, kaltsium-dipikolinaadile ja dodeküülamiinile (Setlow, 2003). Huvitaval kombel toimub selliste mutantsete spooride aeglane, kuid pidev spontaanne idanemine, mille mehhanism on seni selgusetuks jäänud (Paidhungat ja Setlow, 2000). Need idanemist esilekutsuvad ained, mis ei ole toitained ega muropeptiidid, arvatakse toimivat läbi toitainetete indutseeritud

idanemismehhanismi, kuid jättes vahele selle mõningaid etappe (Paidhungat ja Setlow, 2000). Muropeptiidid indutseerivad *B. subtilis*'e spooride idanemist läbi PrkC retseptori, mis on oma olemuselt sarnane eukarüootide väga konserveerunud katalüütilise domeeniga seriini-treoniinikinaasile (Shah *et al.*, 2008). PrkC fosforüleerib translatsiooni elongatsioonifaktor G-d (EF-G), see ilmselt reguleerib viimase aktiivsust. PrkC kinaasse aktiivsuse olulisust näitab fakt, et spooride ärkamine on inhibeeritav staurosporiiniga, mis on laia spetsiifikaga proteiinkinaaside inhibiitor.

1.6.2 Väljumine VBNC seisundist

Väljumist VBNC seisundist on uuritud vaid väheste bakterite puhul (Oliver 2005). Põhiline raskus seisneb katsesüsteemi leidmises, mille puhul oleks kindel, et VBNC seisundis populatsiooni väljakasv pärineb mittekultiveeritava populatsiooni liikmest, mitte VBNC populatsiooni hulka juhuslikult sattunud kultiveeritavast rakust (Oliver 2005). Merebakter *Vibrio vulnificus*'e populatsioon muutub mittekultiveeritavaks, kui viia temperatuur alla 10°C ning temperatuuri tõstmisel kasv taastub (Oliver 2005, Oliver 2010). Oliver'i sõnul on tegu selge näitega VBNC-seisundis bakteritest. Minu meelest võib see olla lihtsalt selle bakteri kasvatamiseks ebasobiv temperatuur. *Legionella pneumophila* on amööbi *Acanthamoeba castellanii* rakusisene parasiit, kuid võib reostunud joogiveega kanduda ka inimesele, tekitades legionelloosi. *L. pneumophila* siseneb soikeolekusse vastusena näljale ning hüpokloritile, kuid tema aktiivsus taastub, kui teda inkubeerida koos *A. castellanii* või *A. polyphaga*'ga (Oliver 2010).

Kui *Micococcus luteus*'e statsionaarsesse faasi jõudnud rakud kauemaks kasutatud söötmesse seisma jätta, sisenevad need soikeolekusse, mis võimaldab neil kuni seitse kuud elusana püsida ja nende kultiveeritavus väheneb mitme suurusjärgu võrra (Mukamolova *et al.*, 1998). Kui lisada sellistele rakkudele hilise eksponentsiaalse kasvufaasi kultuurilt eraldatud söödet, taastub nende kultiveeritavus peaaegu täielikult. Selliselt konditsioneeritud söötmest õnnestus 1998. aastal kirjeldada *M. luteus*'e sekreteeritav valk, mis stimuleerib väga tugevalt soikunud rakkude kasvamahakkamist (Mukamolova *et al.*, 1998). Vastavalt toimele sai valk nimeks Rpf - *Resuscitation promoting factor*. Rpf on sekreteeritav kasvufaktor, mis on vajalik nii soikeolekust väljumiseks kui vegetatiivsete rakkude kasvuks minimaalsöötmes väga väikese külvitiheduse korral (Mukamolova *et al.*, 2002b). Tegu on ensüümiga, mis juba pikomolaarsetes kontsentratsioonides lüüsib bakteri rakuseina ning tingib vabanenud muropeptiidide tõttu ülejäänud populatsiooni väljumise soikeseisundist (Mukamolova *et al.*, 2006). Hiljuti on avastatud, et mitmete aktinobakterite kultiveeritavus sõltub Rpf perekonna

valkudest. Sarnaseid geene on leitud mitmetest *Streptomyces*'e liikidest ja *Corynebacterium glutamicum*'ist (Mukamolova *et al.*, 1998). *M. luteus*'e Rpf stimuleerib soikeolekust väljumist lisaks sama liiki bakteritele ka teiste kõrge C+G sisaldusega genoomiga Gram-positiivseid organisme nagu *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium smegmatis* ja *Mycobacterium tuberculosis* (Mukamolova *et al.*, 1998).

Tuberkuloositekitaja *Mycobacterium tuberculosis* tapab aastas rohkem inimesi kui ükski teine bakteriliik eraldi võttes (Mukamolova *et al.*, 2002a). On leitud, et Rpf perekonna valgud mängivad olulist rolli *M. tuberculosis*'e virulentsuses (Kana *et al.*, 2008). *M. tuberculosis*'e ja *M. bovis*'e genoomist on leitud viis geeni, mille produktid sarnanevad *Micrococcus luteus*'e Rpf-valgule (Mukamolova *et al.*, 2002a, Mukamolova *et al.*, 2006). Nende geenide produktid stimuleerivad samuti soikunud mikroobide kasvu ja on aktiivsed pikomolaarsetes, mõnel puhul isegi madalamates kontsentratsioonides (Mukamolova *et al.*, 2002a). Oma 2002. aasta töös näitasid Mukamolova *et al.*, et *M. tuberculosis*'e Rpf-laadsed valgud aitavad soikeseisundist väljuda nii aeglase kasvuga *M. bovis*'e, kui ka kiire kasvuga *M. luteus*'e ja *M. smegmatis*'e rakkudel.

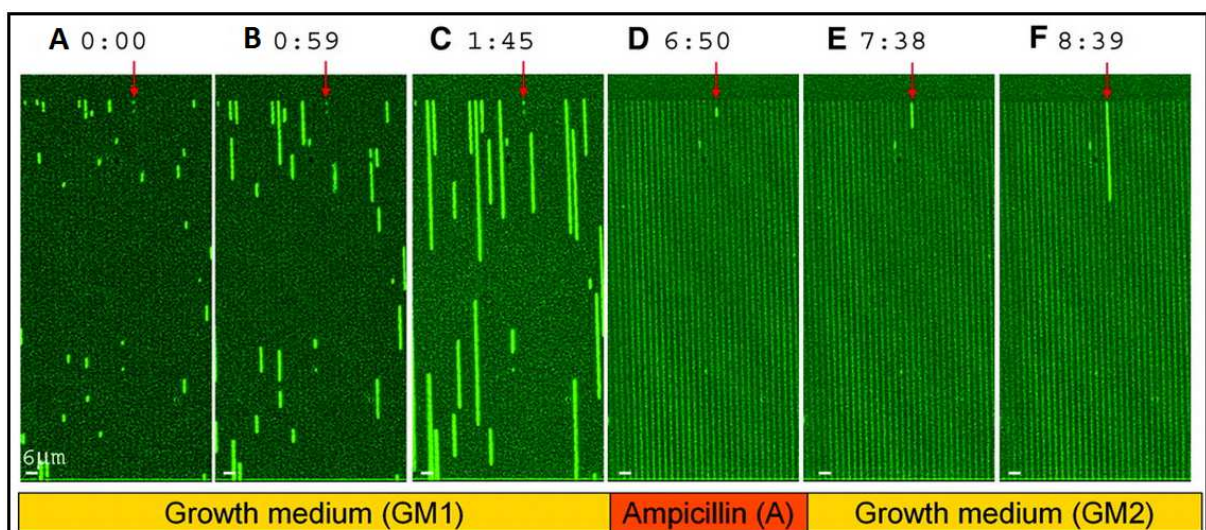
On näidatud, et *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium suudab VBNC seisundist väljuda vastusena trihüdoksamaat siderofoor ferrioksaamiin E-le ning ja *S. enterica* S. Typhimurium ning enterohemorraagiline *E. coli* vastusena antioksidant oksüraasile ja enterobakterite poolt sekreteeritava kuumuskindlale autoinduktorile (Reissbrodt *et al.*, 2002). Kõnealuse autoinduktori struktuur on veel kindlaks tegemata, kuid on kindel, et tegu ei ole homoseriinlaktooniga ega autoinduktor-2 sarnase molekuliga (Reissbrodt *et al.*, 2002).

1.6.3 Persisterite aktiveerumine

Persisteriteks nimetatakse baktereid, kes elavad mittegeneetiliste mehhanismide abil üle töötlemise bakteritsiidsete antibiootikumidega ja on võimelised kasvamist jätkama, kui antibiootikum on kasvukeskkonnast eemaldatud. Kuigi persistentsuse fenomen on tuntud juba ligi seitsekümmend aastat, on selle olemusest vähe teada. Kuna persisterid moodustavad bakterikultuurist väga väikese osa, on neid keeruline uurida. Pärast pikka pausi persisterite avastamisest J. W. Biggeri poolt 1944. aastal hakkas fenomeni vastu 1980. aastail huvi tundma ameeriklasest mikrobioloog Harris Moyed. Moyedil õnnestus isoleerida mitu *E. coli* K-12 tüve mutanti, kelle kultuurides oli persisterite sagedus kõrgem kui metsiktüüpi tüves. Vastavalt mutatsiooni efektile sai muteerunud geen nimeks *hipA* - high persistence, kuna sel geenil puudusid muud teadaolevad funktsioonid (Moyed ja Bertrand, 1983). Praeguseks on

teada, et *hipBA* operon kodeerib toksiin-antitoksiin moodulit, HipB valk on antitoksiin ning HipA on toksiin, mis fosforüleerib elongatsioonifaktor Tu-d. (Maisonneuve *et al.*, 2011) Toksiin-antitoksiin süsteem koosneb kahest üksteisega seonduvast valgust, toksiin on stabiilne, antitoksiin ebastabiilne. Kui antitoksiini mingil põhjusel enam ei toodeta, langeb antitoksiini tase ja vabanenud toksiin inhibeerib raku kasvu.

Suurimad edusammud persisterite uurimisel on tehtud viimase kümnendi jooksul. Põhiliseks väljakutseks on olnud aparatuuri ja meetoodika arendamine, mis lubaks baktereid ükshaaval jälgida. Balaban ja kollegid avaldasid 2004. aastal ilmunud artiklis faaskontrastmikroskoopiat ja mikrofluidikat kasutava meetodi, mis võimaldab jälgida iga bakterirakku tavatingimustel ja antibiootikumitöötluste ajal, uurida ellujäänud rakke ja saada infot nii nende käitumise kohta antibiootikumitöötluste eelnenud ajal kui uurida tema järglaskonda (joonis 5).



Joonis 5. Faaskontrastmikroskoobi fotod kollast fluorestseeruvat valku ekspresseerivate *E. coli hipA7* bakterite kasvamisest mikrofluidikaseadmes. Paneelidel A-C on kujutatud üleöökuultuurist värskesse söötmesse viidud rakkude kasvu, paneelil D on sama kultuur vahetult pärast kasvavate rakkude lüüsimist ampitsilliiniga ning paneelidel E ja F pärast ampitsilliinitöötlust alles jäänud rakud – persisterid. Punane nool osutab pärast antibiootikumitöötlust kasvama hakanud persisterile. (Balaban *et al.*, 2004)

Selle meetodi põhiliseks puuduseks on analüüsitava rakkude väike hulk, küll aga võimaldab edukalt jälgida iga raku kasvamist. Joonisel 5 on kujutatud kollast fluorestseeruvat valku ekspresseerivaid *E. coli* rakke, kes on külvatud vaolise pinna ja poolläbilaskva membraani vahele. Kanalite laius vastab ligikaudu ühe bakteri laiusele, nii et tekkivad mikrokolooniad moodustavad plaadile helendavad triibud. Ampitsilliinitöötlus lüüsib peptidoglükaani sünteesivate bakterite rakuseina ja alles jäävad vaid soikeseisundis rakud. Punase noolega osutatud rakk on persister, kes enne ampitsilliinitöötlust ei kasvanud, kuid hiljem aktiveerus ja

moodustas koloonia. Hoolikal vaatamisel võib jooniselt leida veel kaks helendavat täppi, rakku, kes soikeseisundist ei väljunud. (Balaban *et al.*, 2004)

Oma töös lähenevad Balaban ja kolleegid persisteritele küllaltki matemaatiliselt ja jagavad need loodud mudelite põhjal kaheks alatüübiks: tüüp I persisterid, kes on tekkinud statsionaarses faasis ning tüüp II persisterid, kes on pidevalt, kuid väga aeglaselt kasvavad rakud (Balaban *et al.*, 2004).

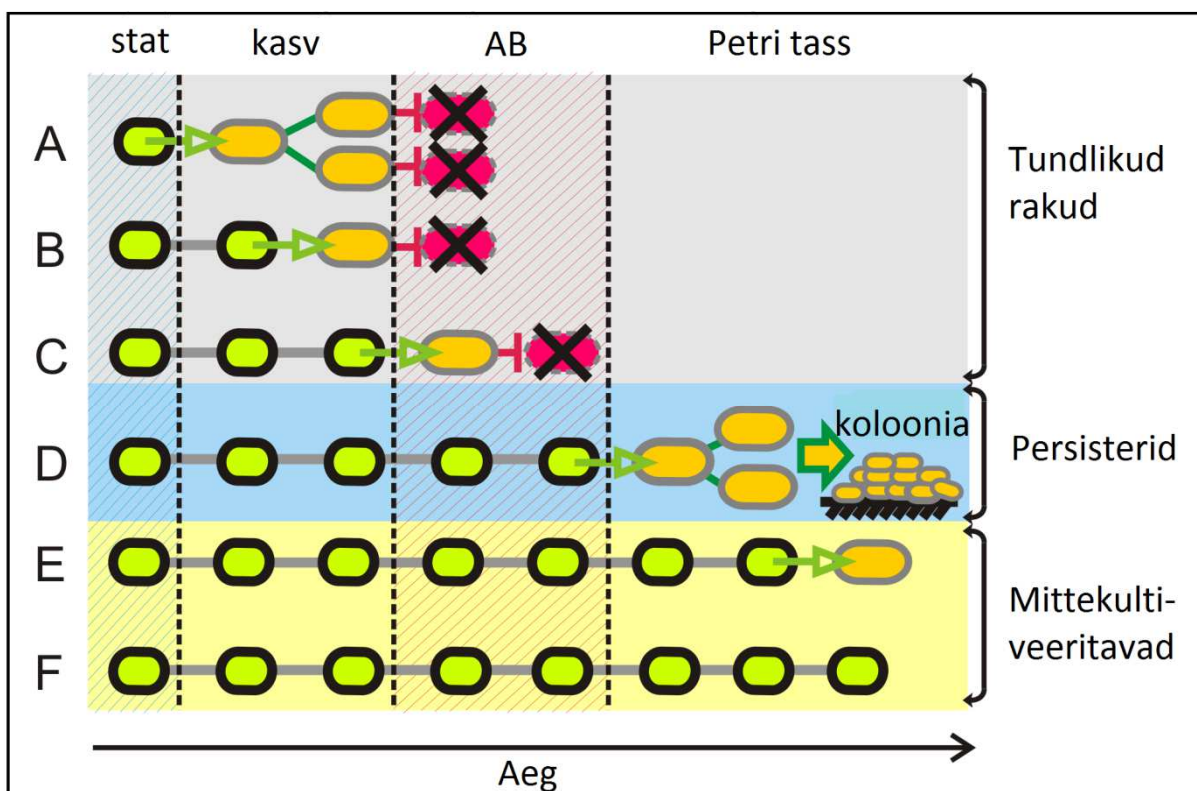
1.6.4 Aktiveerumine pärast statsionaarset faasi

Üheks rakutsükli etapiks, kus bakterite metaboolne aktiivsus on madal ja pooldumist ei toimu, on statsionaarne faas. Lisaks toitainetele võivad statsionaarsest faasist toibumiseks hoogu anda ka teiste bakterite poolt sekreteeritavad ained. Oma 2001. aasta töös iseloomustavad Weichart ja Kell *E. coli* kasutatud söötmest eraldatud molekuli, mis stimuleerib statsionaarse faasi rakkude aktiveerumist. Tehti kindlaks, et uuritav aine oli kuumus- ja happeskindel, proteaasidele resistentne ja dialüüsitav, samas kui seda ei olnud võimalik söötmest etüülatsetaadiga ekstraheerida ega ioonvahetuskromatograafia abil eraldada. Küll aga õnnestus neil aktiivset materjali ekstraheedia soolaga küllastatud supernatandist etanooli abil. Leiti, et tegu on väikese, mittevalgulise ja mitteioonse orgaanilise molekuliga, kuid täpne keemiline struktuur jäi välja selgitamata. (Weichart ja Kell, 2001)

2008. aastal töötati meie laboris välja meetodika fenotüübiliselt heterogeensete populatsioonide uurimiseks, mis põhineb voolutsütomeetrial ja helenduvate reportervalkude sünteesil või nende väljalahjenemisel (Roostalu *et al.* 2008). See meetodika lubab kiiresti ja usaldusväärselt analüüsida suurt hulka rakke. Selles töös leiti, et eksponentsiaalse faasi rakkude jagunemine on homogeenne ning et statsionaarse faasi rakud ei jagune. Statsionaarse faasi rakkude külvamisel värskesse söötmesse eristus kaks alampopulatsiooni - rakud, kes muutusid kiirelt metaboolselt aktiivseks ning hakkasid jagunema, ning rakud, kes ei aktiveerunud. Inaktiivne populatsioon oli ampitsilliini suhtes tolerantne ning pärast antibiootikumi eemaldamist hakkas osa neist jagunema, vastates seega persisteri definitsioonile. (Roostalu *et al.*, 2008)

Varemesitatud mudeli kohaselt on statsionaarse faasi kultuuris nõ „normaalsed rakud“ ja persistorid. Kui kultuur viia uuesti kasvutingimustesse, siis hakkavad „normaalsed“ rakud kohe kasvama ja need antibiootikumiga lüüesides jäävad järgi vaid persistorid. Katsed meie töögrupis on seadnud sellise lihtsa mudeli kahtluse alla. Nimelt on võimalik saada samast statsionaarse faasi kultuurist erinev hulk persistoreid, sõltuvalt sellest, milline on värske sööde

kuhu rakud viiakse (Jöers *et al.* 2010). Autorite poolt välja pakutud mudeli kohaselt toimub peale kasvutingimustesse viimist ajas heterogeenne kasvu taastumine ja persistorite hulk väljendab selleks hetkeks veel mitte kasvu alustanud rakkude hulka. Et erinevates söötmetes on ärkamiskineetika erinev, siis ongi detekteeritav persistorite sagedus sõltuv konkreetsetest kasvutingimustest (joonis 6).



Joonis 6. Bakterite kasvamahakkamise mudel. Pärast värskesse söötmesse viimist hakkavad statsionaarse faasi rakud kasvama erinevatel aegadel. Need rakud, kes hakkavad kasvama enne antibiootikumitöötlust või selle ajal, defineeritakse kui antibiootikumi suhtes tundlikud rakud (A - C). Kui rakud hakkavad kasvama teatud aja jooksul pärast antibiootikumi sööttest eemaldamist, nimetatakse neid persisteriteks (D). Kui rakud jätkavad kasvamist ja moodustavad koloonia liiga hilja, et neid üleöö inkubeeritud Petri tassilt lugeda võiks, või ei ärka üldse, defineeritakse neid kui mittekultiveeritavaid rakke (E, F). Stat- statsionaarne faas, AB – antibiootikum. (Jöers *et al.*, 2010)

Soikeolekust väljumine võib olla nii konkreetne ja hästi jägitav sündmus nagu spooride idanemine kui ka morfoloogiliselt eristamatu nagu persisterite muutumine metaboolselt aktiivseteks rakkudeks. Morfoloogiliselt sarnaste aktiiv- ja soikeolekute vahele range piiri tõmbamine on üpris keeruline, nagu ka erinevalt nimetatud soikeolekute range piiritlemine. Persisterid, VBNC seisundis ja statsionaarses faasis olevad rakud on paljuski sarnased. Nende metabolism on väga madalal tasemel ja morfoloogiliselt nad aktiivselt kasvavatest rakkudest ei erine. Nii VBNC seisund kui persistentsus on iseloomulik nii Gram-positiivsetele kui -negatiivsetele bakteritele. Üks kriteerium vahe tegemiseks on nende osakaal kultuuris.

Kirjanduse andmetel moodustavad persisterid kultuurist väga väikese osa, enamasti antakse kirjanduses nende hulgaks $10^{-4} - 10^{-6}$ populatsioonist (Keren *et al.*, 2004, Moyed ja Bertrand, 1983), kuid kultiveerimatuks võib muutuda kogu populatsioon (Mukamolova *et al.*, 1998). Ka statsionaarses faasis koosneb kogu populatsioon mittejagunevatest rakkudest (Roostalu *et al.*, 2008). Meie töögrupis tehtud eksperimentide andmetel on tegu osaliselt kattuvate terminitega. Bakterite klassifitseerimine persisteriteks, mittekultiveeritavateks ja statsionaarses faasis olevateks on mõnevõrra kunstlik ja sõltub paljuski eksperimendi metoodikast. On keeruline seada raame sellele, millise aja jooksul antibiootikumiga töödeldud kultuuris ellu jäänud ja koloonia moodustanud bakterid klassifitseeruvad persisteriteks, millised kultiveerimatuteks, kuna bakterid alustavad kasvamist erinevatel aegadel. Samuti on keeruline määratleda raku surnukstunnistamise hetke ja täie kindlusega öelda, kui pika aja jooksul mitteärganud rakk enam kunagi ärkamiseks võimeline ei ole. Endospoorid võivad säilda eluvõimelisena väga pikka aega, miks siis mitte ka teistes soikeolekutes viibivad rakud.

On teada, et rakud väljuvad soikeseisundist vastusena toitainetele. On aga ka arvatud, et lisaks võib see sündmus täiesti juhuslik ning valitsevatest keskkonnaoludest sõltumatu. Seda iseloomustab hästi skaudihüpotees (Epstein, 2009b). Selle mudeli kohaselt jaotub iga klonaalne mikroobipopulatsioon kaheks erineva fenotüübiga grupiks - metaboolselt aktiivsed ja soikeolekus rakud, mille omavaheline suhe sõltub parasjagu valitsevatest keskkonnatingimustest. Soodsates oludes on suurem osa rakkudest aktiivsed, kuid väike osa metaboolselt inaktiivne. Kehvade tingimuste saabudes jäävad ellu soikeseisundis rakud ning moodustavad populatsiooni enamuse. Stohhastilistel põhjustel aktiveerub aeg-ajalt mõne mikroobi metabolism - selliseid soikeseisundist väljunud baktereid nimetatakse skautideks. Skaut ei ole spetsialiseerunud bakter ega geneetiliselt vanempopulatsioonist erinev mikroob. Skaudi väljumine soikeolekust on madalal sagedusel ilmnevate juhuslike sündmuste tagajärg. Seetõttu aktiveeruvad skaudid nii siis, kui nad moodustavad populatsiooni enamuse, kui ka siis, kui suurem osa rakke on aktiivsed. Juhul, kui olud kasvu ei soosi, tarvitab rakk oma sisemised ressursid lõpuni ning hukkub. Kui aga keskkond on soodne, paneb skaut aluse uuele mikroobipopulatsioonile. Selline strateegia võiks olla kohane muutuvates keskkondades elavatele mikroobidele, kus hukkuvate bakterite kaotuse kaalub üles keskkonna monitoorimise arvelt säästetud ressurss. (Epstein, 2009b)

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

E. coli rakkude metaboolne aktiveerumine pärast soikeolekut on küllaltki puudulikult uuritud protsess. Eeskätt peitub selle põhjus vastava metoodika vajakajäämistes. Varasemad meetodid on lubanud uurida bakterikultuure tervikuna, iseloomustades neid näiteks läbi optilise tiheduse muudu, kuid selliselt ei ole võimalik kindlaks teha, kas muutuse tingib kõikide rakkude järglaskond või vaid väheste kasvamahakanud rakkude paljunemine. Mikroskoopiameetodid võimaldavad küll rakke üksikhaaval jälgida, kuid kvantitatiivseks analüüsiks vajaliku hulga rakkude lugemine on väga aeganõudev. Meie laboris välja töötatud läbivoolutsütomeetriameetod (Roostalu *et al.*, 2008) annab hea võimaluse uurida statsionaarses faasis rakkude aktiveerumiskineetikat rakkhaaval ja jälgida erineva fenotüübiga alampopulatsioonide teket.

Käesoleva töö eesmärkideks olid:

- Süsinikunäljast tingitult statsionaarses faasis olevate *E. coli* rakkude aktiveerumisdünaamika kirjeldamine vastusena uue süsinikuallika lisamisele;
- kasvamahakkamist mõjutavate faktorite iseloomustamine.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1 Bakteritüved, söötmed, plasmiidid

Kõikide eksperimentide läbiviimiseks kasutati *E. coli* K-12 tüve BW25113 (F⁻, Δ (*araD-araB*)567, Δ *lacZ*4787(::*rrnB*-3), λ ⁻, *rph*-1, Δ (*rhaD-rhaB*)568, *hsdR*514). Tüvi sisaldas plasmide pETgfp mut2 AGGAGG (3) ja pBAD-Crimson. Esimene neist sisaldab *GFPmut2* geeni IPTG-ga indutseeritava *tac*-promooteri all ja kanamütsiini resistentsusgeeni. Teine plasmiid sisaldab punase fluorestseeruva valgu Crimson geeni arabinoosiga indutseeritava pBAD-promooteri all ja klooramfenikooli resistentsusgeeni. Baktereid kasvatati alati temperatuuril 37 °C. Vastavalt plasmiidide resistentsusmarkeritele lisati söötmesse kanamütsiini ja klooramfenikooli lõppkontsentratsiooniga 25 µg/ml. Kasutati MOPS söödet, mis sisaldas süsinikuallikana erinevaid suhkruid. MOPS sööde on keemiliselt defineeritud minimaalsööde, mida saab kasutada erinevate süsinikuallikatega ning milles saab tekitada lämmastiku- ja fosforinälga.

Tabel 1. Käesolevas töös kasutatud söötmed

Nimetus	Iseloomustus	Allikas
MOPS Gly	Sisaldas süsinikuallikana 0,1% glütserooli	Neidhardt <i>et al.</i> , 1974.
MOPS Glt	Sisaldas süsinikuallikana 0,2% glükonaati	Neidhardt <i>et al.</i> , 1974.
MOPS Glc	Sisaldas süsinikuallikana 0,2% glükoosi	Neidhardt <i>et al.</i> , 1974.

2.2.2 Katsete formaat

Baktereid kasvatati kolm, neli või viis päeva 37 °C juures MOPS Gly söötmes, kuhu oli lisatud kanamütsiini ja klooramfenikooli, kumbagi 25 µg/ml, ning 1 mM arabinoosi. Kultuuride kasvatamiseks kasutati kas Sanyo loksutit kiirusel 220 rpm või Heidolph Unimax 1010 loksutit kiirusel 155 rpm. Söötme vahetamiseks fuugiti baktereid 15 või 7 minutit 5000 g juures, kasutades selleks vastavalt kas Sigma 4K15C fuugi rootoriga 11150 või Eppendorf MiniSpin fuugi rootoriga F-45-12-11. Supernatant eemaldati ning bakterid suspendeeriti samas mahus värskes või konditsioneeritud söötmes. Koheselt lisati 1 mM IPTG-d. Ampitsilliiniga katsetes lisati koheselt ka ampitsilliin kontsentratsioonis 150 µg/ml. Alates uude söötmesse viimise hetkest võeti proove iga kahe tunni tagant kuni kaheksanda kasvutunnini ja üks proov võeti järgmisel päeval. Eksperimendi käigus võetud proovid segati 1:1 30% glütserooli lahusega 1x PBS-s ja hoiustati voolutsütmeetrilise analüüsini -80 °C juures.

2.2.3 Läbivoolutsütomeetria

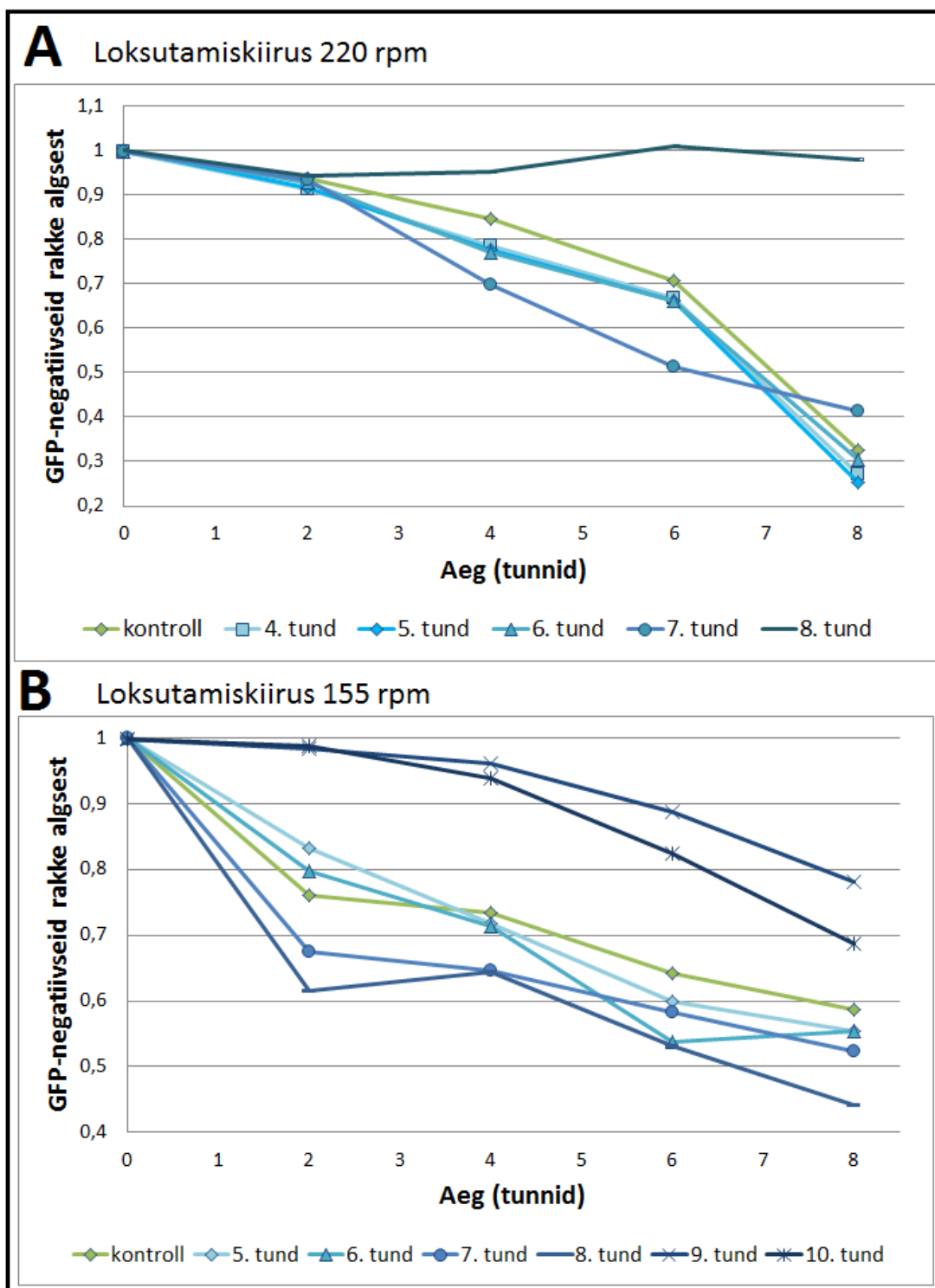
Kõikides eksperimentides kasutati bakterite ühe raku tasemel analüüsimiseks läbivoolutsütomeetrit (FACSCalibur, Becton ja Dickinson). Külmutatud proovid lahjendati PBS-s 10 µl proovi 500 µl PBS-i kohta, kui kasutati tuubist lugemist, ja 1 µl 200 µl PBS-i kohta, kui loeti plaadilt. Saadud andmete analüüsimiseks kasutati programmi FlowJo 7.5 (Treestar, Inc.)

2.2.4 Söötme konditsioneerimine

Söötmete konditsioneerimiseks kasvatati rakke 3 päeva kas Sanyo loksutil kiirusel 220 rpm või Heidolph Unimax 1010 loksutil 155 kiirusel rpm MOPS Gly söötmes antibiootikumide ja arabinoosi juuresolekul. Seejärel vahetati sööde värske MOPS Glt vastu, kuhu oli lisatud IPTG-d. Alates 4. kasvutunnist 10. kasvutunnini (sõltuvalt eksperimendist) võeti voolutsütomeetriliseks analüüsiks proov ja eemaldati konditsioneerimiseks piisav kogus kultuuri. Eemaldatud kultuuris fuugiti rakud põhja, eemaldati supernatant ning filtreeriti see läbi 0,2 µm poorisuurusega filtri. Sel viisil konditsioneeritud söödet säilitati külmutatuna -80°C juures. Konditsioneeritud söötme mõju testiti 4 või 5 päeva MOPS Gly söötmes kasvanud rakkudel, vahetades nende söötme eelkirjeldatud moel kas värske või konditsioneeritud söötme vastu. Kultuuridest võeti iga kahe tunni järel proov, mida analüüsiti hiljem voolutsütomeetri abil. Sel moel tehti kindlaks, millisel ajahetkel millistes kasvutingimustes konditsioneeritud sööde omas kõige tugevamat efekti statsionaarse faasi rakkude kasvamahakkamisdünaamikale.

Söötme konditsioneerimisel 125 ml kolvis Sanyo loksutil 220 rpm juures kasvasid rakud kiiresti. Võrreldes neil tingimustel 7. ja 8. tunnil konditsioneeritud söötmeid (joonis 7, paneel A), tuleb välja, et 7. tunnil konditsioneeritud sööde mõjutab märgatavalt statsionaarse faasi rakkude kasvamahakkamist, samas kui rakud 8. tunnil konditsioneeritud söötmes kasvada ei suuda. Selle põhjuseks on bakterikultuuri kiire kasv konditsioneeritavas söötmes – ilmselt ei sisaldanud 8. tunnil konditsioneeritud sööde enam piisavalt süsinikuallikat, et võimaldada järgmise kultuuri kasvu. Seetõttu otsustasime otsida söötme konditsioneerimiseks optimaalsemaid tingimusi. Konditsioneerides söödet Heidolph Unimax 1010 loksutil 155 rpm juures ja kasvatades 100 ml kultuuri 125 ml kolvis, tarvitas kultuur süsinikuallikat aeglasemalt ja konditsioneeritud söötme mõju võrreldes värske kontrollsöötmega tuli paremini välja (joonis 7, paneel B). Süsinikuallika lõppemine polnud nii järsk, mistõttu on see

söötme konditsioneerimiseks parem meetod kui esimene. Konditsioneeritud söötme all on alati mõeldud kasutatud MOPS Glt söödet.



Joonis 7. Erinevatel loksutamiskiirustel ja eri aegadel konditsioneeritud söötmete mõju statsionaarse faasi rakkude kasvamahakkamisele. X-teljel on aeg tundes, y-teljel GFP-negatiivsete (soikeolekus) rakkude osakaal nullhetkel loetud GFP-negatiivsetest rakkudest. Kontrollisöötmeks on värske MOPS Glt, tunnid tähistavad, mitmendal kultuuri kasvutunnil on konditsioneeritud sööde konditsioneerimiseks eemaldatud. Katset on korratud kolm korda, esitatud on representatiivne näide.

2.2.5 Eksperimendid ampitsilliiniga

Katsete jaoks, kus võrreldi rakkude käitumist ampitsilliini juuresolekul ja ilma, kasvati ette 3 päeva MOPS Gly söötmel arabinoosi ja antibiootikumide juuresolekul kasvanud kultuur. Vana sööde vahetati kas MOPS Glc või konditsioneeritud või värske MOPS Glt vastu. Ampitsilliin lisati alati söötmevahetuse käigus kontsentratsioonis 150 µg/ml. Ajahetk 0 vastab katsetes söötmevahetuse hetkele. Kultuuridest võeti proove iga kahe tunni järel kuni kaheksanda kasvutunnini ja üks proov järgmisel päeval ning analüüsiti voolutsütomeetri abil.

2.2.6 Söötme ekstraktsioon etüülatsetaadiga

Tundmatu rakkude kasvamahakkamist stimuleeriva metaboliidi eraldamiseks söötmest ekstraheeriti konditsioneeritud söödet etüülatsetaadiga. Selleks lisati 10 ml söötmele 10 ml etüülatsetaati ja segati vortexil 5-10 minutit. Oodati, kuni etüülatsetaadi- ja vesifaas eraldusid või kiirendati faaside lahutumist tsentrifuugimisega. Etüülatsetaadi faas eemaldati. Söötmele lisati veel 5 ml etüülatsetaati ja protsessi korrati. Etüülatsetaat aurustati keeduklaasis ja lisati 3-5 ml destilleeritud vett. Kindlustamaks, et kogu lahustuv materjal vees üles lahustuks, loksutati keeduklaasi ning uhuti pipeti abil keeduklaasi põhja ja seinu sellesama veega. Negatiivse kontrolli jaoks ekstraheeriti samal moel värsket MOPS Glt söödet. Ekstraktid alikvooditi 1 ml kaupa 1,5 ml katsutitesse ja säilitati -80 °C juures.

2.2.7 Söötme fraktsioneerimine C-18 pöördfaasikolonniga

Pöördfaasikromatograafia on vedelikkromatograafia liik. Statsionaarse faasina, mis kolonnist läbi liikuvaid molekule enda külge seob ja siis jälle lahti laseb, kasutatakse enamasti silikageeli terakesi, mille külge on keemiliselt seotud alküülrühmad. Mobiilne faas ehk eluent, mis läbi kolonni voolates uuritavaid aineid edasi kannab, on pöördfaasikromatograafia korral sageli orgaaniline lahusti, näiteks metanool või atsetonitriili, segatuna algse puhverlahuse või veega.

Söötme fraktsioneerimiseks kasutati 3M Empore 7mm/3ml C18-SD pöördfaasikolonni. Elueerimiseks kasutati metanooli kolmes eri kontsentratsiooniga vesilahuses – 20%, 50% ja 80%. Kolonnist jooksutati läbi 10 ml konditsioneeritud söödet. Läbijooks jagati kaheks, esmalt eemaldati 2 ml läbijooksnud söödet ja seejärel, kui ka ülejäänud 8 ml oli kolonni läbinud, võeti sellest 2 ml proov ja hoiustati -80 °C juures. Kolonni pesti 1,5 ml destilleeritud veega, mis säilitati analüüsimiseks -80 °C juures. Kolonni elueeriti esmalt 300 µl 20% metanooli vesilahusega, seejärel 300 µl 50% ja viimasena 300 µl 80% metanooliga.

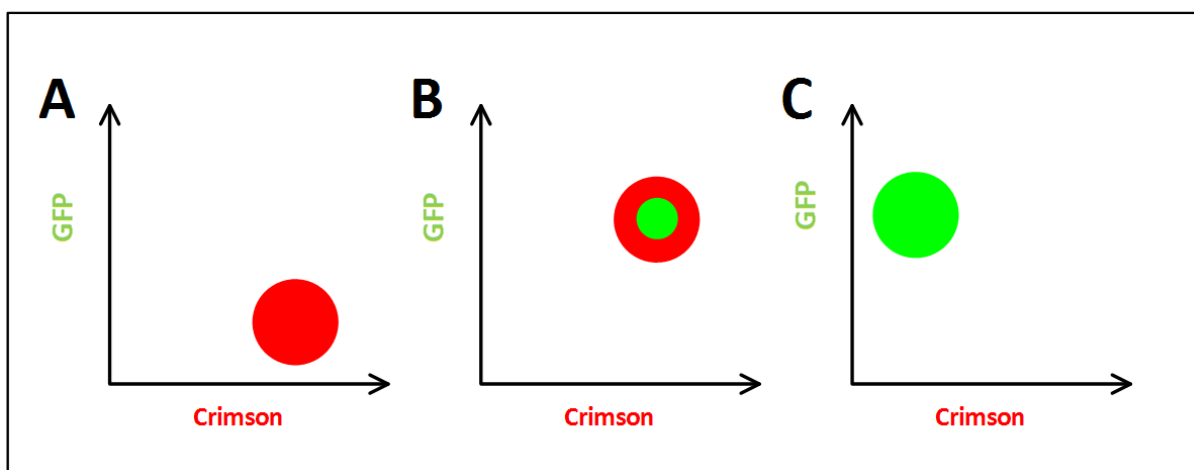
Fraktsioonid koguti eraldi katsutitesse ja kuivatati Heto MAXI Dry Plus vaakumkuivatis 37 °C juures. Kuivatatud fraktsioonidele lisati 1,5 ml destilleeritud vett ja säilitati samuti -80 °C juures.

Läbijooksu, pesuvee ja fraktsioonide testimiseks proovid sulatati ja lisati kõigile 0,2% Glt ja 1 mM IPTG-d. Pesuveele ja metanoolifraktsioonidele lisati veel vett, 10x MOPS puhvrit, lämmastikuallikana 9,52 mM NH_4Cl ja fosforiallikana 1,32 mM KH_2PO_4 . Segud valmistati nii, et segu lõppmaht oleks 2 ml.

Testimiseks kasutati viis päeva MOPS Gly söötmes Heidolph Unimax 1010 loksutil 155 rpm juures kasvanud rakukultuuri. 2 ml kultuuri sööde vahetati 2 ml läbijooksu, pesuvee või metanoolifraktsiooni vastu ja võeti proove iga kahe tunni tagant kuni kaheksanda kasvutunnini ja üks proov järgmisel päeval. Proovid segati 1:1 30% glütserooli lahusega 1x PBS-s ja hoiustati voolutsütmeetrilise analüüsini -80 °C juures.

2.3. Tulemused

Käesoleva töö eesmärkideks oli süsinikunälja tõttu statsionaarses faasis *E. coli* rakkude aktiveerumisdünaamika kirjeldamine ja kasvamahakkamist mõjutavate faktorite iseloomustamine. Selleks kasutati järgneva ülesehitusega katseskeemi: Rakke kasvatati kolm, neli või viis päeva MOPS minimaalsöötmes, kuhu oli lisatud süsinikuallikana 0,1% glütserooli (Gly), kanamütsiini 25 µg/ml ja klooramfenikooli 25 µg/ml ning arabinoosi 1 mM, mida see *E. coli* tüvi ei suuda süsinikuallikana kasutada. Arabinoosi lisati punase fluorestseeruva valgu Crimson sünteesi indutseerimiseks. Statsionaarsesse faasi jõudnud rakud sisaldavad Crimsonit, kuid ei sisalda GFPd (joonis 8A). Seejärel vahetati vana sööde värske söötmega vastu (MOPS + 0,2% süsinikuallikat), kus arabinoosi enam ei olnud, ning lisati IPTG indutseerimaks GFP ekspressiooni. Kasvama hakkavad rakud sünteesivad muude valkude kõrval ka GFP-d (joonis 8B), samas kui soikeolekus rakud jäävad GFP-negatiivseteks. Nii markeerib GFP signaal rakkude metaboolset aktiivsust. Rakkude pooldumisel väheneb arabinoosi puudumise tõttu Crimsoni sisaldus rakkudes, mistõttu väheneb nende punane helenduvus (joonis 8C). Nii punaselt fluorestseeruv valk Crimson kui roheliselt fluorestseeruv valk GFPmut2 on väga stabiilsed, poolestusajaga vastavalt üle viie ja üle seitsme päeva (Strack *et al.*, 2009; Blokpoel *et al.*, 2003). Muutust rakkude helenduvuses jälgiti voolutsütomeetri abil.



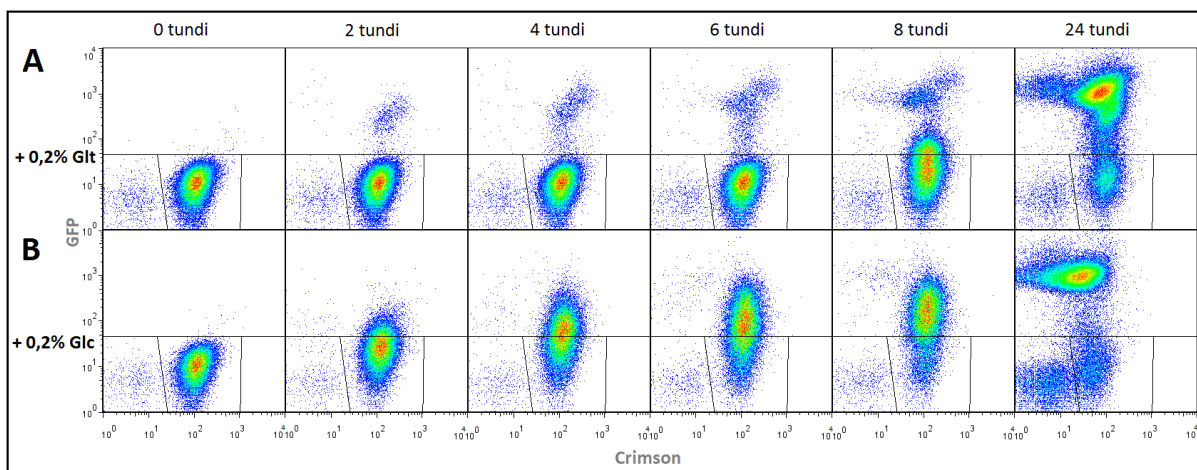
Joonis 8. Lihtsustatud skeem bakterite metabolismi aktiveerumise ja rakujagunemise jälgimise kohta läbivoolutsütomeetria abil kahe reportergeeni signaali tugevuse põhjal. Rakupopulatsioon on kujutatud ringina. X-telje väärtused näitavad punaselt fluorestseeruva valgu Crimson'i signaali tugevust ning Y-telje väärtused GFP signaali intensiivsust. Paneelil A on kujutatud olukorda, kus rakkudes on indutseeritud ainult Crimson, paneelil B on indutseeritud nii Crimson kui GFP ning paneelil C on indutseeritud vaid GFP.

2.3.1 Statsionaarsest faasist väljumisel võib bakterirakkude metaboolne aktiveerumine olla heterogeenne

Uue süsinikuallika lisamisel süsinikunäljas statsionaarses faasis bakterikultuurile hakkavad rakud taas kasvama ja jagunema. See protsess võib olla nii homogeenne, misjuhul on rakkude reaktsioon uuele süsinikuallikale ühtne, kui ka heterogeenne, kui populatsioon jaguneb erinevalt reageerivateks alamhulkadeks.

Joonisel 9 on näidatud olukorda, kus kolm päeva MOPS 0,1% glütserooli (MOPS Gly) sisaldaval minimaalsöötmes kasvanud rakkudele on lisatud kas MOPS 0,2% glükonaati (MOPS Glt) või 0,2% glükoosi (MOPS Glc). Esimesel juhul on kasvamaminek heterogeenne – esmalt aktiveerub väike hulk rakke, misjärel alustab kasvamist suurem osa populatsioonist. Teisel juhul on samast statsionaarse faasi kultuurist pärinevate rakkude käitumine täiesti erinev – kasvamahakkamine toimub ühtse grupina. Alati leidub väike hulk rakke, kes ei aktiveeru.

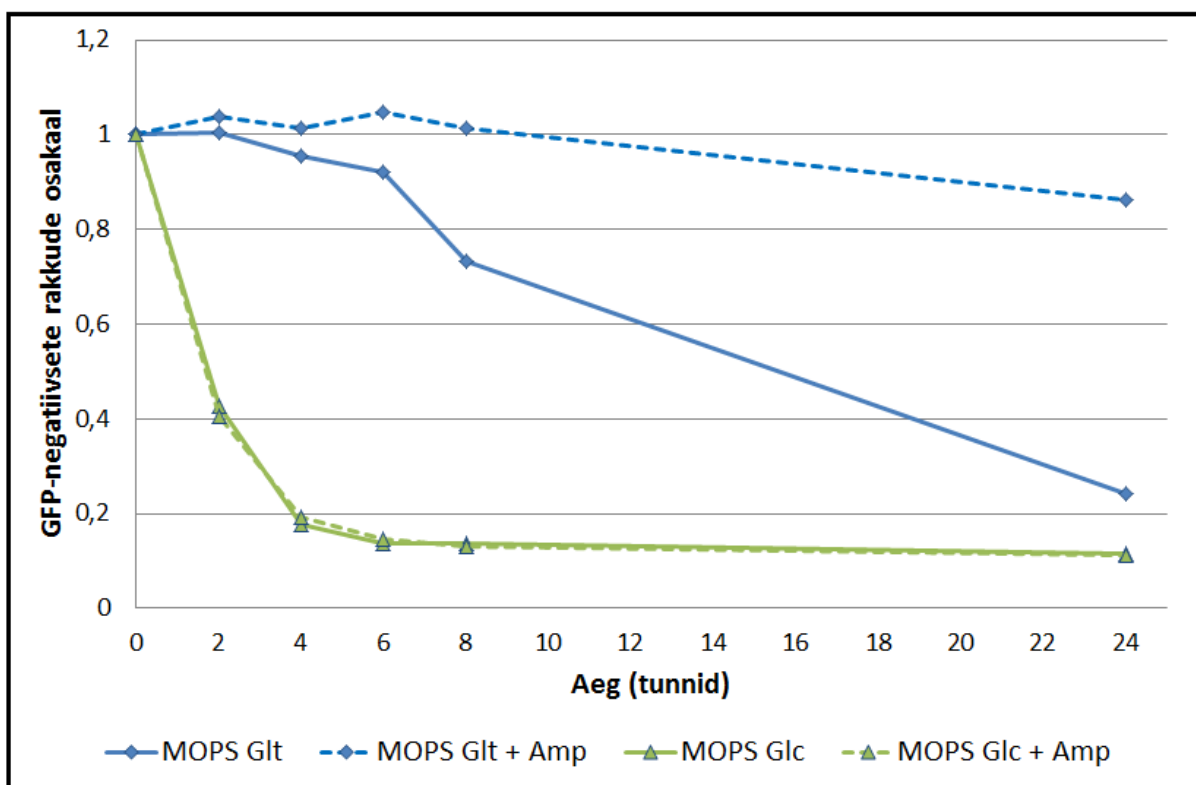
Heterogeenne kasvamahakkamine glükonaadi lisamisel toimub justnagu kahe lainena. Esmalt reageerib väike hulk rakke, kellest osa jõuab juba jaguneda ja alles siis muutub enamus populatsioonist metaboolset aktiivseks. Selline rakkude käitumine võimaldab spekuloida, et varakult kasvamaläinud rakud mõjutavad kuidagi hilisemaid rakke.



Joonis 9. Statsionaarset faasist väljumise dünaamika sõltub süsinikuallikast. Statsionaarse faasi rakud suspendeeriti värskes söötmes, mis sisaldas süsinikuallikana 0,2% glükonaati (paneel A) või 0,2% glükoosi (paneel B) ja lisati IPTGd. Ajahetk 0 vastab söötmevahetuse hetkele. Toodud ajapunktidel võeti kultuurist proovid ning analüüsiti voolutsütomeetri abil. Pseudovärvid näitavad rakkude esinemissagedust. Eksperimenti korrati kaks korda, esitatud on representatiivne näide.

2.3.2 Metaboolset aktiveerunud rakud stimuleerivad statsionaarses faasis rakkude aktiveerumist

Kui juba kasvavad ja jagunevad rakud suudavad mõjutada veel soikeolekus rakkude aktiveerumist, siis peaks viimaste aktiveerimiskiirus olema sõltuv kasvavate rakkude hulgast. Selle väite kontrollimiseks saab kasutada ampitsilliini, mis mõjub ainult kasvavatele rakkudele ning lüüsib need, jättes soikeolekus rakud puutumata. Lisades neli päeva MOPS Gly sisaldavas söötmes kasvanud rakkudele glükoosi, aktiveeruvad rakud olenemata ampitsilliini juuresolekust või puudumisest ning väljuvad soikeolekust kiiresti ja ühtselt (joonis 10). Vahe ilmneb aga nende kultuuride puhul, kuhu on teise süsinikuallikana lisatud glükonaati. Ilma ampitsilliinitöötluseta kultuuris läheb esmalt kasvama väike hulk rakke, misjärel aktiveeruvad ülejäänud rakud. Kui poolduvad rakud ampitsilliiniga ära lüüsida, jääb suurem osa rakke soikeolekusse. Sellistest tulemustest järeldub, et varem poolduvad rakud mõjutavad tõepoolest ülejäänud rakupopulatsiooni käitumist ning stimuleerivad mingil moel rakke soikeolekust väljuma.



Joonis 10. Soikeolekust väljumise kiirus sõltub kasvavate rakkude olemasolust. Neli päeva MOPS Gly söötmes kasvanud rakkude sööde vahetati värske MOPS minimaalsöötme vastu, mis sisaldas süsinikuallikana kas 0,2% glükoosi või 0,2% glükonaati. Pooldunud rakkude elimineerimiseks kasutati ampitsilliini kontsentratsioonis 150 µg/ml, paralleelkultuuri antibiootikumi ei lisatud. X-teljel on aeg tundides, y-teljel GFP-negatiivsete (soikeolekus) rakkude osakaal nullhetkel loetud GFP-negatiivsetest rakkudest. Eksperimenti viidi läbi kaks korda, esitatud on representatiivne näide.

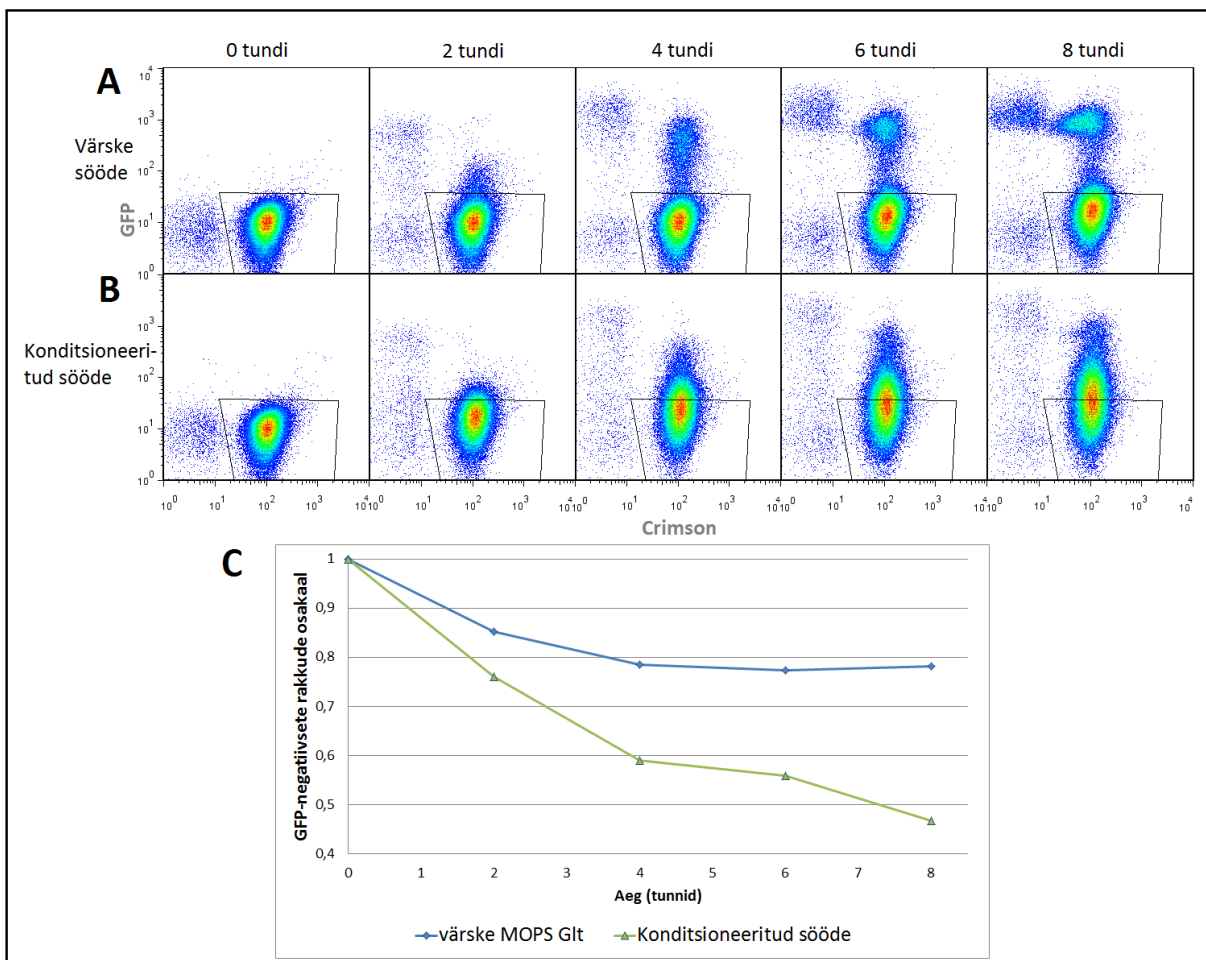
2.3.3 Varem aktiveerunud rakud mõjutavad hilisemaid ärkajaid sekreteeritava faktori, faktor X-i kaudu

Bakterirakud võivad üksteist mõjutada nii sekreteeritavate faktorite kui otseste rakk-rakk kontaktide kaudu. Sekreteeritavate faktorite tuntuimaks näiteks on hulgatunnetusega seotud molekulid, homoseriinlaktoonid, mida rakud ümbritsevasse keskkonda sekreteerivad ning mille kontsentratsioonidele vastavalt nad reageerivad (viide). Rakk-rakk kontaktide abil võivad rakud näiteks üksteise kasvu pärssida. *E. coli* puhul on kirjeldatud CDI (*contact dependent inhibition*) autoinhibitsioonisüsteem, mille käigus pärsib osa populatsiooni rakke pöördvalt ülejäänud rakkude kasvu (Aoki *et al.*, 2009). *cdiABI* geeniklastri poolt kodeeritud valgud CdiA ja CdiB pärsivad naaberraku kasvu ning CdiI valk annab esimest kaht geeni ekspresseerivale rakule immuunsuse nende valkude kasvupärssiva toime suhtes.

Uurimaks, mil moel varem kasvama hakanud rakud hilisemaid aktiveerujaid mõjutavad, viidi läbi eksperiment konditsioneeritud söötmega. Juhul, kui mõjur on sekreteeritav, muutub rakkude käitumine mõjurit sisaldava söötme korral. Rakk-rakk kontaktide läbi toimiva efekti korral on vaja metaboolselt aktiivsete rakkude otsest kohalolu, mistõttu konditsioneeritud sööde rakupopulatsiooni käitumist ei mõjutaks.

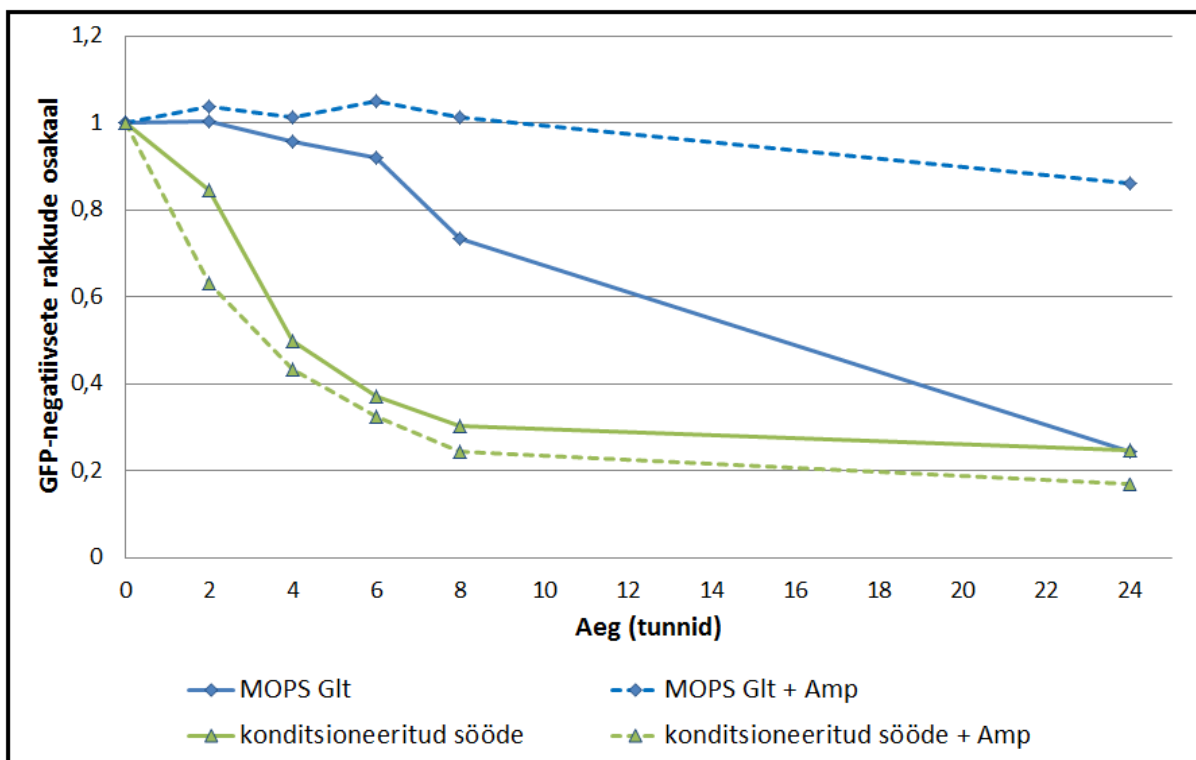
Konditsioneeritud sööde valmistati järgmiselt: MOPS Gly sisaldaval söötmes kasvanud rakud viidi neljandal päeval värskesse MOPS Glt sisaldavasse söötmesse. Kulruuri edenemist monitooriti FACS'il ning rakud eemaldati söötimest, kui esmalt aktiveerunud rakud poolduma hakkasid ning ülejäänud populatsiooni GFP-tase tõusma hakkas. Bakterid eraldati söötimest fuugimisel 15 minutit 5000 g juures, eraldati supernatant ning filtreeriti läbi 0,2 µm poorisuurusega filtri. Selliselt konditsioneeritud söödet säilitati sügavkülmikus -80°C juures.

Konditsioneeritud MOPS Glt söötme lisamine statsionaarses faasis olevatele rakkudele põhjustas selge muutuse rakkude kasvamahakkamise dünaamikas võrrelduna värskes MOPS Glt söötmega (joonis 11). Konditsioneeritud söötme korral oli rakkude „ärkamine“ soikeolekust kiirem ja ühtlasem. Kuna rakuvaba sööde suudab stimuleerida rakkude aktiveerumist, on selge, et tegu on sekreteeritava toimeaine, mitte rakk-rakk interaktsioonidega. Lihtsuse mõttes nimetan seda aktiivsust edasises tekstis nimega faktor X.



Joonis 11. Statsionaarset faasist väljumise dünaamika sõltub sekreteeritava faktori olemasolust söötmes. Rakke kasvatati 4 päeva MOPS Gly söötmes, ajahetk 0 vastab söötmevahetuse hetkele. Paneelil A on vana sööde vahetatud värske MOPS Glt sisaldava minimaalsöötme vastu. Paneelil B on vana sööde vahetatud konditsioneeritud MOPS Glt söötme vastu. Mõlemale söötmele oli lisatud IPTG-d, indutseerimaks GFP ekspressiooni. Toodud ajapunktidel võeti kultuurist proovid ning analüüsiti voolutsütomeetri abil. Graafikute x-telg näitab punast helenduvust vastavalt rakkude Crimson-valgu sisaldusele ning y-telg rohelist helenduvust vastavalt GFP-sisaldusele. Paneelil C on kahe kultuuri kvantitatiivne võrdlus. X-teljel on aeg tundides, y-teljel GFP-negatiivsete (soikeolekus) rakkude osakaal nullhetkel loetud GFP-negatiivsetest rakkudest. Eksperimenti korrati kuus korda. Esitatud on representatiivne näide.

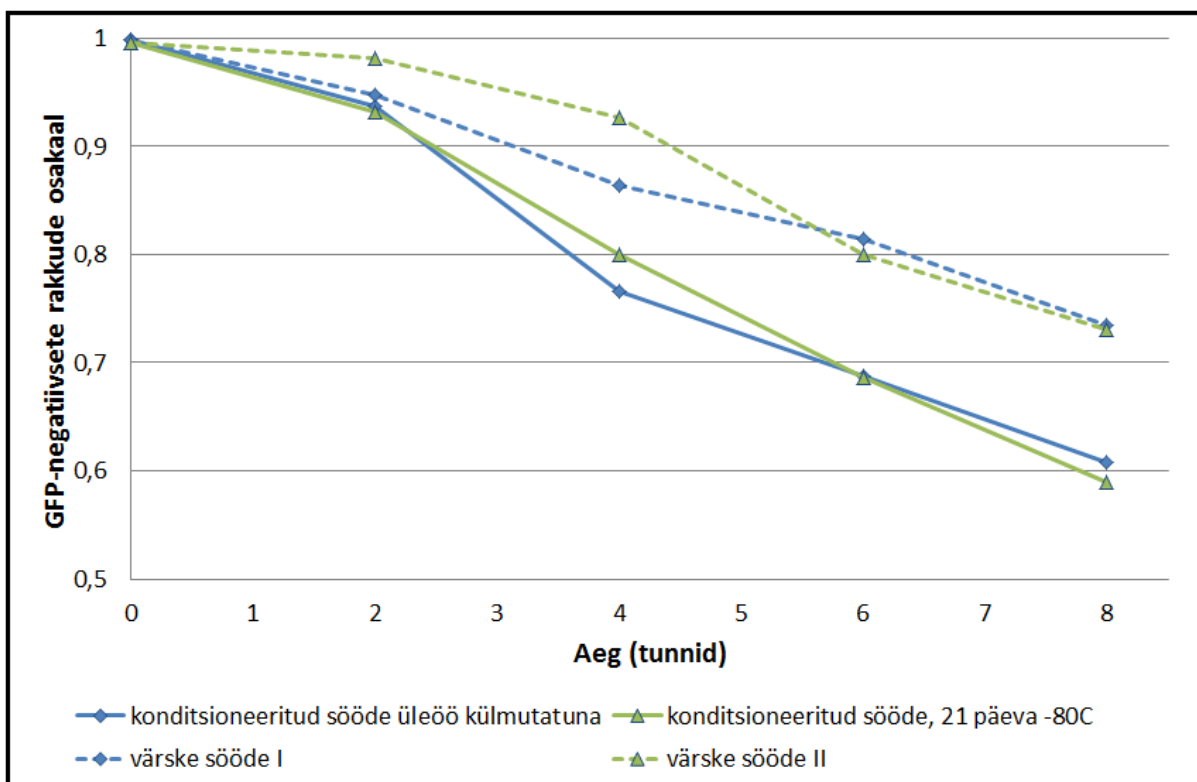
Saamaks täiendavat kinnitust, et stimuleerivat mõju avaldab sekreteeritav aine, kombineeriti samas katses konditsioneeritud söötme ja ampitsilliini kasutamist. Kui kasvama hakkavad rakud juhitud oma käitumises põhimiselt faktor X-i olemasolust, siis ei tohiks konditsioneeritud söötme puhul kasvavate rakkude olemasolu suurt rolli enam mängida. Selle eelduse testimiseks lisati soikeolekus rakkudele konditsioneeritud söödelt koos ja ilma ampitsilliini. Joonisel 12 näidatud tulemuste põhjal võib öelda, et hoolimata ampitsilliini juuresolekust hakkasid rakud konditsioneeritud söötmes kiiresti kasvama. Seega piisab kiireks aktivatsiooniks faktor X-i olemasolust ja täiendav jagunevate rakkude juuresolek erilist efekti ei oma.



Joonis 12. Faktor X on peamine rakkude aktiveerumist mõjutav tegur. Neli päeva MOPS Gly söötmes kasvanud rakkude sööde vahetati kas värskelt MOPS Glt või konditsioneeritud söötme vastu. Ühele paralleelile lisati ampitsilliini (katkendjooned), teisele mitte (pidevjooned). X-teljel on aeg tundides, y-teljel GFP-negatiivsete (soikeolekus) rakkude osakaal nullhetkel loetud GFP-negatiivsetest rakkudest. Eksperiment viidi läbi ühel korral.

2.3.4 Konditsioneeritud sööde säilitab aktiivsuse ka külmutamisel

Kuna söötme konditsioneerimine suures mahus hõlbustaks oluliselt selle komponentide uurimist, oli oluline veenduda, et sööde säilitab oma aktiivsuse ka külmutamisel -80°C juures. Selleks võrreldi ühe ja sama konditsioneeritud söötme efekti statsionaarse faasi rakkudele eri aegadel pärast söötme külmutamist. Konditsioneeritud söötmega viidi läbi kaks eksperimenti, üks päeval pärast söötme konditsioneerimist ning teine kakskümmend üks päeva pärast konditsioneerimist. Mõlema tarvis kasvatati MOPS Gly söötmes ette kolm päeva statsionaarses faasis viibinud bakterikultuur ning võrreldi konditsioneeritud söötme efekti värskelt MOPS Glt söötme lisamisega (joonis 13). Saadud tulemuste põhjal võib öelda, et ka pikemaajalisel külmutamisel konditsioneeritud söötme omadused praktiliselt ei muutu, faktor X jääb söötmesse alles.



Joonis 13. Konditsioneeritud söötme aktiivsus säilib ka pikaajalisel külmutamisel -80°C juures. Neli päeva MOPS Gly söötmes kasvanud rakkudele lisati kas konditsioneeritud söödet või värsket MOPS Glt söödet. Konditsioneeritud söötmega viidi läbi kaks iseseisvat eksperimenti, üks konditsioneerimisjärgsel päeval (sinised jooned) ning teine 21 päeva pärast konditsioneerimist (rohelised jooned). Mõlemas eksperimendis oli kontrolliks värske sööde. X-teljel on aeg tundides, y-teljel GFP-positiivsete (soikeolekus) rakkude osakaal kõikidest loetud rakkudest antud ajahetkel. Võrreldud on tulemusi eraldiseisvatest eksperimentidest.

2.3.5 Faktor X'i puhastamine konditsioneeritud sööttest

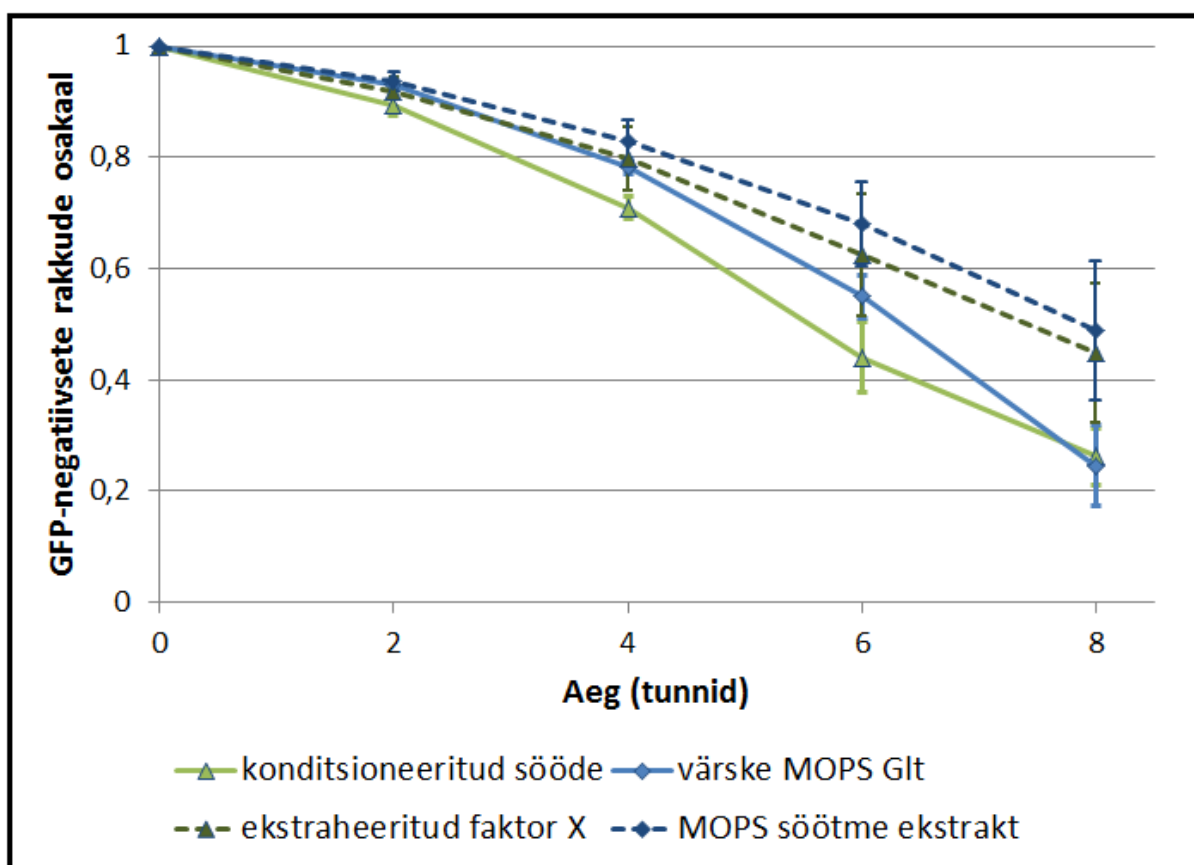
2.3.5.1 Faktor X'i ekstraheerimine etüülatsetaadiga

Faktor X'i näol on tegu tundmatu ainega, mille struktuurist ega laengust pole midagi teada. Et selgitada välja, mis ainega on tegu, otsustasime esmalt proovida, kas seda ainet on võimalik sööttest etüülatsetaadi abil välja ekstraheerida. Juhul, kui tegu on ainega, mis on vesikeskkonnas lahustuv, kuid võimeline iseseisvalt, retseptori abita membraane läbima, on see eeldatavasti osaliselt hüdrofoobne. Etüülatsetaati kasutatakse edukalt sööttest homoseriinlaktoonide ekstraheerimiseks. Etüülatsetaat on veest kergem, veega mittesegunev ja hästi lenduv lahusti.

Ekstraheerimisel lisati 20 ml konditsioneeritud söötmele esmalt 10 ml etüülatsetaati, segati Vortexi maksimumkiirusel 10 minutit, et faasid seguneks, faaside lahutumisel eraldati etüülatsetaadi faas ning korrati tegevust 5 ml etüülatsetaadiga samal söötmel. Seejärel aurustati etüülatsetaat ning kuivatusnõusse lisati destilleeritud vesi, et eraldatud ained uuesti

vees lahustada. Etüülatsetaadi aurustumisel moodustus esmalt geel, mis täielikunal kuivamisel vees lahustumatuks kilejaks polümeeriks muutus. Etüülatsetaat pärssib bakterite kasvu juba väikeses koguses, mistõttu oli oluline jälgida, et kogu etüülatsetaat enne vee lisamist ära oleks auranud. Sel põhjusel polnud võimalik ka testida, kas ekstraheeritud sööde säilitas aktiivsuse või mitte. Katse kontrolliks töödeldi samal viisil ka värsket MOPS Glt söödet.

Ekstraktsiooni õnnestumist kontrolliti statsionaarse faasi rakkudel, lisades neile värsket MOPS Glt söödet, konditsioneeritud söödet või vastavate söötmete ekstrakte. Jooniselt 14 on näha, et ekstrakti lisamine värsele söötmele ei kiirenda rakkude ärkamist, seega söötme ekstraheerimine etüülatsetaadiga ei ole faktor X'i eraldamiseks efektiivne meetod.



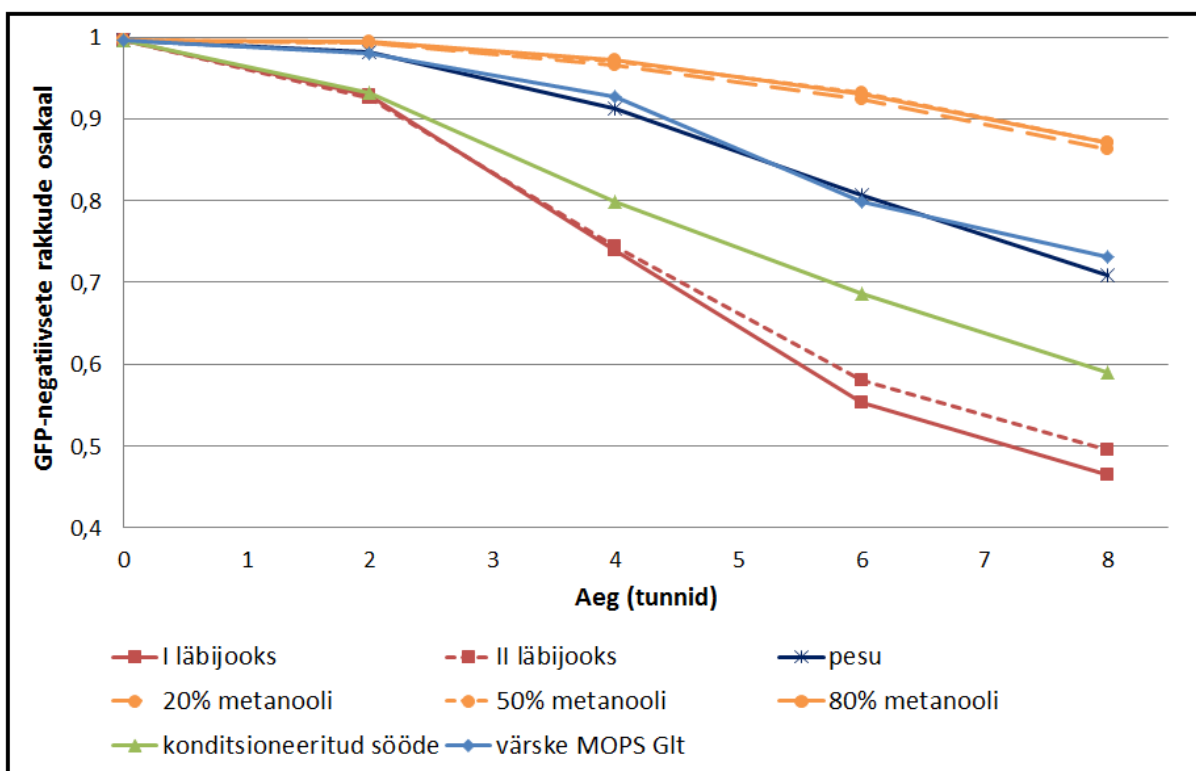
Joonis 14. Konditsioneeritud söötme ekstraheerimine etüülatsetaadiga. Pidevate joontega on näidatud ekstraheerimata söötmed, katkendjoontega söötmed, mida on etüülatsetaadiga ekstraheeritud. X-teljel on aeg tundides, y-teljel GFP-negatiivsete (soikeolekus) rakkude osakaal kõikidest loetud rakkudest antud ajahetkel. Graafikul on näidatud viie katse keskmised tulemused ja standardviga.

2.3.5.2 Faktor X'i puhastamine söötmest pöördfaasikolonni abil.

Paljud bakterite autokriinsed faktorid on hüdrofoobsed molekulid, seega otsustasime vaatamata ebaedule ekstraheerimisel proovida veel faktor X'i puhastamist pöördfaasikolonnil. Selleks kasutasime Empore™ 3M C18 pöördfaasikolonne.

Pöördfaasikromatograafia puhul kasutatakse hüdrofoobse membraaniga kolonni, mille puhul jäävad hüdrofiilses keskkonnas olevad hüdrofoobsed molekulid seotuks hüdrofoobse kandjaga. Lisades membraanile vähempolaarseid orgaanilisi lahusteid tulevad sinna kinni jäänud molekulid lahti ning väljuvad kolonnist. Mida hüdrofoobsema molekuliga on tegu, seda kauem jääb ta seotuks tahke kandjaga ning seda kontsentreeritumat orgaanilist lahustit on vaja, et molekul membraanilt vabaneks.

Pöördfaasikolonnist lasti läbi voolata 10 ml konditsioneeritud söödet. Koguti kokku läbijooksnud sööde, esmalt 2 ml ja siis ülejäänud 8 ml. Seejärel pesti kolonni 1,5 ml destilleeritud veega, mis koguti samuti kokku ning testiti. Kolonnile kinnitunud materjal elueeriti kolme eri kontsentratsiooniga metanoolilahusega (20%, 50% ja 80%), alustades madalamast kontsentratsioonist liikudes kõrgemani. Metanooli sisaldavad fraktsioonid kuivatati vaakumkuivati abil ning lisati destilleeritud vesi, lahustamaks üles fraktsioonis sisaldunud aineid. Saadud lahuseid testiti soikeolekus rakkudel (joonis 15) mille käigus ilmnes, et tugevaim kasvamahakkamise dünaamikat muutev efekt oli kolonnist läbi jooksnud söötmel. Metanoolifraktsioonidesse oli jäänud midagi kasvu pärssivat, samas kui kolonni pesemiseks kasutatud vesi andis sama efekti, mis värske MOPS Glt sööde. Aktiivsus jäi väga selgelt kolonni läbijooksu, mistõttu võib öelda, et tegu on pigem hüdrofiilse molekuliga ja hüdrofoobset pöördfaasikolonni faktor X'i puhastamiseks kasutada ei saa.



Joonis 15. Pöördfaasikolonne läbijooksude, pesuvee ning metanoolifraktsioonide mõju testimine soikeolekus rakkudel. Punaste joontega on näidatud kolonne läbijooksud, siniste joontega värske MOPS Glt ning kolonne pesuvesi ja oranžide joontega metanooli sisaldanud fraktsioonid. Rohelise joonega on algne konditsioneeritud sööde, mida ekstraheeriti. X-teljel on aeg tundides, y-teljel GFP-negatiivsete (soikeolekus) rakkude osakaal kõikidest loetud rakkudest antud ajahetkel. Katses kasutatud konditsioneeritud söötme viidi eksperiment läbi ühe korra.

2.4. Arutelu

Oma bakalaureusetöös kirjeldasin *E. coli* tüve BW25113 statsionaarse faasi süsinikunäljas rakkude käitumist vastusena uuele süsinikuallikale. Leidsin, et kasvamahakkamine võib olla nii heterogeenne kui homogeenne. Lisades statsionaarse faasi rakkudele 0,2% glükoosi, hakkavad kõik rakud ühtselt kasvama, samas kui lisada 0,2% glükonaati, on aktiveerumine ajas heterogeenne: osad rakud reageerivad kohe, osad aga alles hiljem. Viimasel juhul sekreteerivad varem aktiveerunud rakud söötmesse tundmatut ainet, mis stimuleerib ülejäänud populatsiooni kasvamahakkamist. Nimetasin selle aine faktor X-iks. Selle aine iseloomustamiseks töötasin välja katseskeemi, mis võimaldab konditsioneerida söödet nii, et see sisaldab rakkude kasvu tagamiseks piisava süsinikuallika kontsentratsiooni juures maksimaalset kogust faktor X-i. Rakuvaba konditsioneeritud sööde säilitab oma aktiivsuse ka pikemaajalisel säilitamisel -80°C juures. Proovisin faktor X-i söötimest etüülatsetaadi abil ekstraheerida ning pöördfaasikoloni abil eraldada, kuid ebaõnnestunult. On alust oletada, et faktor X on oma olemuselt hüdrofiilne aine.

Statsionaarse faasi rakkudele glükonaadi lisamisel jagunes rakupopulatsioon kaheks eri fenotüübiga alamhulgaks – ühed, kes asusid kohe kasvama ja teised, kes jäid alguses inaktiivseks. Fenotüübiline heterogeensus tähendab, et sama genotüübiga organismidel võib samades oludes olla erinev fenotüüp ning see ei ole bakterite hulgas üldse haruldane nähtus. Üks paremini uuritud näiteid on *Bacillus subtilis*, Gram-positiivne bakter, kelle geneetiliselt identses populatsioonis esineb eksponentsiaalses kasvufaasis kaks väga erinevat rakutüüpi: pikkadeks kettideks liitunud sessiilseted rakud ja liikuvad viburitega rakud (Kearns ja Losick, 2005). Sageli peetakse fenotüübilise varieeruvuse esinemist riskihajutusstrateegiaks. *Bet-hedging* ehk riskide hajutamine on strateegia, mis vähendab populatsiooni kohasuse ajalist varieeruvust, kuid langetab populatsiooni keskmist kohasust ehk vähendab kogu populatsiooni hävimise ohtu ettenägematute olude ilmnemisel (Simons, 2011). Üks tuntuimaid näiteid bet-hedging strateegiast on vesikirbu *Diaptomus sanguineus*'e munemisstrateegia – osa munadest koorub koheselt, osa aga aasta pärast. Juhul, kui kohe koorunud vastsed kalade poolt ära süüakse, on ikkagi vesikirpe, kes hiljem uuele populatsioonile aluse paneks (Simons, 2011).

On oluline eristada keskkonnast tingitud muutusi organismi fenotüübis keskkonnast sõtumatult olemas olevatest tunnustest. *Bet-hedging*'u korral on juba enne keskkonna muutumist võimalik populatsiooni teatud tunnuste alusel alampopulatsioonideks jagada, kuid keskkonnale reageerimise strateegiate puhul ilmneb vahe alles pärast keskkonnamuutuse

toimumist. Näiteks ei sõltu vesikirbu *D. sanguineus*'e puhul see, milline osa munadest kohe koorub ja milline osa ootele jääb munadest endist, vaid on ära määratud hetkel, kui emane munad muneb – tegu on riskihajutamisstrateegiaga (Simons, 2011). Reageerimisstrateegia puhul jälgivad rakud pidevalt keskkonda, milles nad viibivad, ja käituvad vastavalt. Näiteks juhul, kui kasvukeskkonnas leidub teatud aminohapet, mida bakter ka ise sünteesida oskab, ei kulutata selle sünteesiks eraldi energiat, vaid tuuakse see sisse rakuvälisest keskkonnast. Alles siis, kui välised varud ammenduvad, lülitatakse sisse vastava aminohappe sünteesiks vajalikud geenid.

Soikeolek (*dormancy*) on rakkude mitteaktiivne seisund, kus märgatavat aine- ja energiavahetust ei toimu. Tavaliselt lähevad organismid soikeolekusse, kui keskkond muutub ebasoodsaks (lõpeb toit, temperatuur langeb jne). Bakterirakud (ja muud organismid) võivad soikeolekusse jääda ka väliskeskkonna paranedes ning see on potentsiaalne *bet-hedging* strateegia, kuna sellest tulenev fenotüübiline varieeruvus võib muutlikes keskkondades kasulikuks osutuda. Persisterid, kes on võimelised üle elama antibiootikumitöötlust, ei ole kultuuris mitte antibiootikumi leidumise tõttu kasvukeskkonnas, vaid on seal olnud juba varem (Lewis, 2008; Balaban *et al.*, 2004). Persisterite mittepalljunemise arvelt on kogu populatsiooni keskmine kohasus küll maksimumist madalam, kuid kuna paljunevad rakud on soikeseisundis rakkudest märksa haavatavamad, on populatsiooni säilumine suurte keskkonnamuutuste korral siiski tagatud ja pika-ajaline kohasus maksimeeritud. Kas persisterite esinemine on evolutsiooni vältel välja kujunenud kui *bet-hedging*, ei saa veel kindlalt väita.

Statsionaarse faasi rakkude kahe-etapiline aktiveerumine võib uue süsinikuallika leidumisel osutuda kasulikuks juhul, kui keskkond muutub järsku letaalseks. Sel juhul surevad aktiveerunud rakud ära, kuid suur osa populatsioonist jääb alles. Just see juhtub katses, kus söötmele oli lisatud ka ampitsilliini. Paralleelkatse, mis tõestas, et sama kultuur on võimeline teisele süsinikuallikale ühtselt reageerima, viitab, et kahe-etapilisus ei ole tingitud rakkude sisemistest piirangutest (joonised 10 ja 12). Kui kasutada sellist konditsioneeritud söödet, milles varem ärganud rakud juba veidi aega kasvanud olid, siis hakkavad statsionaarse faasi rakud ühtselt kasvama ka glükonaadi korral. Sellest järeldub, et kasvavad rakud sekreteerivad söötmesse ainet, mis stimuleerib soikeseisundis rakkude aktiveerumist – faktor X-i.

Aktiivsete rakkude poolt keskkonda eritatud ainete stimuleerivat mõju soikeolekus rakkudele on näidatud varemgi. *Micrococcus luteus*'e sekreteeritav valk Rpf põhjustab juba pikomolaarsetes kontsentratsioonides statsionaarses faasis olevate rakkude kultiveeritavaks

muutumist ja mõjub stimuleerivalt mitte ainult liigikaaslastele, vaid ka teistest liikidest bakteritele (Mukamolova *et al.*, 1998). *B. subtilis*'e spooride idanemist põhjustavad muropeptiidid võivad olla pärit mistahes gram-negatiivselt või sporogeenselt gram-positiivselt bakterilt (Shah *et al.*, 2008). Ei saa välistada ka faktor X-i liikidevahelist mõju.

Kasvavate rakkude poolt kasvukeskkonda eritatavate ainete tajumine on looduslikus elupaigas väga ökonoomne viis saamaks teada, kas olud kasvu soosivad. Lisaks toitainetele on veel väga palju keskkonnategureid, mille olemasolu või puudumine kasvukeskkonna soodsaks või ebasoodsaks muudab. Nende kõikide kontrollimine on väga energiamahukas ja seega oleks esmalt otstarbekas kontrollida, kas teised mikroobid on võimelised selles keskkonnas kasvama. Kui on, siis on olud soodsad tõenäoliselt ka muudele sarnases elupaigas kasvavatele liikidele.

Selline regulatsioon jätab õhku küsimuse, kuidas aktiveeruvad need rakud, kes teistele signaliseerivad. Näiteks, kuidas toimub bakteripopulatsiooni soikeseisundis rakkude aktiveerumine suletud süsteemis, kuhu uusi aktiivseid rakke ei satu, nagu *Mycobacterium tuberculosis*'e põhjustatud latentse infektsiooni korral. Lisaks sellele, et kasvamahakkamine võib toimuda vastusena erinevatele toitainetele, on arvatud, et see võib olla ka spontaanne. Skaudihüpoteesi kohaselt toimub soikeolekus rakkude aktiveerumine pidevalt olenemata keskkonnatingimustest ning et aktiveerumine võib olla tingitud juhuslikust mürastraku geeniekspressioonis (Epstein, 2009). Juhul, kui aktiveerunud rakk ebasoodsates oludes kasvama hakkab, kasutab ta ära oma sisemised ressursid ja hukkub. Kui aga rakk soodsates oludes aktiveerub, saab ta paljuneda ja panna aluse uuele kasvavale populatsioonile ning signaliseerida soikeseisundis rakkudele, et keskkond on soodne (Epstein, 2009). Minu katsed haakuvad skaudihüpoteesiga hästi, kuna esmalt kasvama hakanud rakkude poolt eritatav sekreteeritav faktor X stimuleerib soikeseisundis rakkude aktiveerumist.

Keskkonda sattuv signaal võib olla nii spetsiaalselt selleks mõeldud molekul, kuid ka paratamatult keskkonda sattuv aine, näiteks rakukestakomponendid. Raku kasvamise käigus hüdrolüüsitakse peptidoglükaani vahelisi sidemeid, et lisada uusi peptidoglükaanimonomeere. Gram-negatiivsetel bakteritel on ülejäägina tekkivate muropeptiidide taaskasutamiseks välja kujunenud efektiivsed mehhanismid, kuid Gram-positiivsed bakterid ei suuda neid käidelda ja eritavad need keskkonda (Shah *et al.*, 2008). Kuna *E. coli* on Gram-negatiivne, on vähetõenäoline, et faktor X-i näol on tegu muropeptiidiga.

Hulgatunnetusega seotud autoinduktormolekulid on molekulid, mis on spetsiaalselt sünteesitud ümbritsevate organismidega suhtlemise jaoks. N-atsüül-homoseriinlaktoonid on suur signaalmolekulide klass, kuhu kuulub palju osaliselt hüdrofoobseid molekule, mistõttu on neid võimalik söötimest etüülatsetaadi abil ekstraheerida. Seetõttu otsustasime esmalt proovida, kas ka faktor X-i on võimalik samal moel söötimest puhastada. Ekstraktsioon etüülatsetaadiga on tehniliselt lihtne meetod, mille kasutamisel proov ei lahjene ning saadud ekstrakt on soolavaba, võimaldades edasist analüüsi mass-spektromeetril. Viie korduskatse põhjal võib öelda, et see meetod on antud juhul tulutu.

Söötme fraktsioneerimisel pöördfaasikolonnil sain teada, et faktor X ei ole piisavalt hüdrofoobne, et maatriksiga seonduda ning konditsioneeritud söötme aktiivsus jääb läbijooksu. Kolonni läbijooksude kõrgem aktiivsus võrreldes konditsioneeritud söötmega (joonis 15) võib tuleneda kõrgemast glükonaadi kontsentratsioonist. Kindlustamaks rakkude kasvamist lisasin nii läbijooksudele, pesuveele kui metanoolifraktsioonidele 0,2% glükonaati. Glükonaat on hüdrofiilne molekul ja läbib kolonni, mistõttu oli selle tegelik kontsentratsioon läbijooksus ilmselt kõrgem. Korrektne on katset korrata koos teise negatiivse kontrolliga, milleks on värske MOPS + 0.4% Glt (teoreetiliselt kõrgeim kontsentratsioon, mida läbijooks võis sisaldada).

Järgmiseks sammuks faktor X-i puhastamisel on kasutada näiteks ioonvahetuskromatograafiat ja muid polaarsete molekulide eraldamise meetodeid. Selle projekti lõppeesmärgiks on faktor X identifitseerimine.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti *E. coli* tüve BW25113 statsionaarse faasi süsinikunäljas rakkude aktiveerumist vastusena uuele süsinikuallikale ja iseloomustati kasvamahakkamist mõjutavaid faktoreid. Leiti, et statsionaarsest faasist väljumine võib olla nii homogeenne kui heterogeenne. Viimasel juhul stimuleerivad varem kasvama hakanud bakterid veel statsionaarses faasis viibivate rakkude aktiveerumist. Selgitati välja, et tegu on tundmatu sekreteeritava faktoriga, mida tekstis lihtsuse mõttes faktor X-iks nimetati. Faktor X säilib külmutamisel küllaltki hästi. Faktor X-i uurimiseks töötati välja katseskeem, mis võimaldab söödet nii konditsioneerida, et see simuleeriks maksimaalselt statsionaarses faasis rakkude kasvamahakkamist, sisaldades sealjuures veel rakkude kasvuks piisavalt süsinikuallikat. Faktor X-i söötimest eraldamiseks rakendati kaht meetodit: ekstrakttsiooni etüülatsetaadiga ja fraktsioneerimist pöördfaasikolooni abil. Sarnaselt Weichart'i ja Kell'i iseloomustatud *E. coli* poolt sünteesitud kasvamahakkamist stimuleerivale molekulile ei olnud faktor X-i võimalik söötimest etüülatsetaadiga ekstraheerida (Weichart ja Kell, 2001). Ka söötme fraktsioneerimisel pöördfaasikolonniga jäi kasvamahakkamist stimuleeriv aktiivsus läbijooksu. Sellest selgub, et faktor X on tõenäoliselt pigem hüdrofiilne molekul. Edaspidises töös keskendun faktor X-i tuvastamisele muude meetodite abil.

SUMMARY

EXIT FROM DORMANCY AND THE FACTORS AFFECTING IT IN *ESCHERICHIA COLI*

This thesis focuses on the resuscitation of carbon-starved populations of *Escherichia coli* strain BW25113 in response to new carbon sources and on the characterisation of the factors affecting the resuscitation. The cultures were monitored at a single cell resolution using flow cytometry. It was found that awakening from dormancy can be homogenous as well as heterogeneous. During heterogeneous resuscitation, the metabolically active cells stimulate the resuscitation of dormant cells. The spent medium was found to effect the dynamics of resuscitation of stationary phase cells, and thus it was concluded that the stimulatory substance is a secreted metabolite. As its chemical structure is yet unknown it was referred to as 'factor X' in the text for simplicity. An assay for studying factor X was developed. This assay enables one to condition the medium so that the stimulatory effect is maximised, yet the concentration of the carbon source is high enough to enable bacterial growth. Also, it is possible to store the conditioned media at -80 °C for at least three weeks without altering its stimulatory effect.

In order to purify the factor X from the conditioned medium two different methods were used. First, the conditioned medium was extracted with ethyl acetate but this method proved to be unsuccessful. Second, C-18 reversed phase columns were used to fractionate the conditioned medium. The stimulatory effect remained in the extracted sample and the fractions eluted with methanol showed lower activity than the negative control (fresh MOPS Glt). It was concluded from these results that factor X is a hydrophilic rather than a hydrophobic substance. It is planned to continue the present research project to identify factor X.

KIRJANDUSE LOETELU

- Angert, E. ja Clements, K. (2004). Initiation of intracellular offspring in *Epulopiscium*. *Molecular microbiology* 51: 827–35.
- Balaban, N., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., Leibler, S. (2004). Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch. *Science* 305: 1622-1625.
- Bigger, J. (1944). Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *The Lancet* 244.
- Blokpoel, M., O'Toole, R., Smeulders, M. ja Williams, H. (2003). Development and application of unstable GFP variants to kinetic studies of mycobacterial gene expression. *Journal of microbiological methods* 54: 203–11.
- Drake, J. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 7160–4.
- Dworkin, J. ja Shah, I. (2010). Exit from dormancy in microbial organisms. *Nature reviews. Microbiology* 8: 890–6.
- Eldar, A. ja Elowitz, M. (2010). Functional roles for noise in genetic circuits. *Nature* 467: 167–73.
- Epstein, S. 2009. General model of microbial uncultivability, p. 131–159. *In* S. Epstein (ed.), *Uncultivated microorganisms*, *Microbiology Monographs* vol 10. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature reviews. Microbiology* 1: 117–26.
- Finkel, S. (2006). Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nature reviews. Microbiology* 4: 113–20.
- Jayaraman, R. (2008). Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. *Journal of biosciences* 33: 795–805.

- Kaeberlein, T., Lewis, K. ja Epstein, S. (2002). Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* (New York, N.Y.) 296: 1127–9.
- Kana, B., Gordhan, B., Downing, K., Sung, N., Vostroktunova, G., Machowski, E., Tsenova, L., Young, M., Kaprelyants, A., Kaplan, G. ja Mizrahi, V. (2008). The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. *Molecular microbiology* 67: 672–84.
- Kearns, D. ja Losick, R. (2005). Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes & development* 19: 3083–94.
- Keep, N., Ward, J., Cohen-Gonsaud, M. ja Henderson, B. (2006). Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states. *Trends in microbiology* 14: 271–6.
- Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y. ja Lewis, K. (2004). Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS microbiology letters* 230: 13–8.
- Lee, S., Foley, E. ja Epstein, J. (1944). Mode of Action of Penicillin: I. Bacterial Growth and Penicillin Activity-Staphylococcus aureus FDA. *Journal of bacteriology* 48: 393–9.
- Levin, B. ja Rozen, D. (2006). Non-inherited antibiotic resistance. *Nature reviews. Microbiology* 4: 556–62.
- Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature reviews. Microbiology* 5: 48–56.
- Lewis, K. 2008. Multidrug Tolerance of Biofilms and Persister Cells, p. 107-133. In T. Romero (ed.), *Bacterial Biofilms, Current Topics in Microbiology and Immunology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Lidstrom, M. ja Konopka, M. (2010). The role of physiological heterogeneity in microbial population behavior. *Nature chemical biology* 6: 705–12.
- Luidalepp, H. 2012. Studies on the antibiotic susceptibility of *Escherichia coli*, p. 28-34. Tartu Univeristy Press, Tartu.

Maisonneuve, E., Shakespeare, L., Jørgensen, M. ja Gerdes, K. (2011). Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 13206–11.

Moyed, H. ja Bertrand, K. (1983). *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *Journal of bacteriology* 155: 768–75.

Mukamolova, G., Kaprelyants, A., Young, D., Young, M. ja Kell, D. (1998). A bacterial cytokine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 8916–21.

Mukamolova, G., Turapov, O., Young, D., Kaprelyants, A., Kell, D. ja Young, M. (2002a). A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology* 46: 623–35.

Mukamolova, G., Turapov, O., Kazarian, K., Telkov, M., Kaprelyants, A., Kell, D. ja Young, M. (2002b). The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. *Molecular microbiology* 46: 611–21.

Mukamolova, G., Murzin, A., Salina, E., Demina, G., Kell, D., Kaprelyants, A. ja Young, M. (2006). Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. *Molecular microbiology* 59: 84–98.

Navarro Llorens, J., Tormo, A. ja Martínez-García, E. (2010). Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews* 34: 476–95.

Neidhardt, F., Bloch, P. ja Smith, D. (1974). Culture medium for enterobacteria. *Journal of bacteriology* 119: 736–47.

Oliver, J. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of microbiology* (Seoul, Korea) 43 Spec No: 93–100.

Oliver, J. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews* 34: 415–25.

Paidhungat, M. ja Setlow, P. (2000). Role of ger proteins in nutrient and nonnutrient triggering of spore germination in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 182: 2513–9.

- Reissbrodt, R., Rienaeker, I., Romanova, J., Freestone, P., Haigh, R., Lyte, M., Tschäpe, H. ja Williams, P. (2002). Resuscitation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium and enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer. *Applied and environmental microbiology* 68: 4788–94.
- Roostalu, J., Jõers, A., Luidalepp, H., Kaldalu, N. ja Tenson, T. (2008). Cell division in *Escherichia coli* cultures monitored at single cell resolution. *BMC microbiology* 8: 68.
- Setlow, P. (2003). Spore germination. *Current opinion in microbiology* 6: 550–6.
- Shah, I., Laaberki, M.-H., Popham, D. ja Dworkin, J. (2008). A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell* 135: 486–96.
- Shleeva, M., Mukamolova, G., Young, M., Williams, H. ja Kaprelyants, A. (2004). Formation of “non-culturable” cells of *Mycobacterium smegmatis* in stationary phase in response to growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation. *Microbiology (Reading, England)* 150: 1687–97.
- Strack, R., Hein, B., Bhattacharyya, D., Hell, S., Keenan, R. ja Glick, B. (2009). A rapidly maturing far-red derivative of DsRed-Express2 for whole-cell labeling. *Biochemistry* 48: 8279–81.
- Vreeland, R., Rosenzweig, W. ja Powers, D. (2000). Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* 407: 897–900.
- Wagner, J. ja Brun, Y. (2007). Out on a limb: how the *Caulobacter* stalk can boost the study of bacterial cell shape. *Molecular microbiology* 64: 28–33.
- Wang, J. ja Levin, P. (2009). Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. *Nature reviews. Microbiology* 7: 822–7.
- Ward, R. ja Angert, E. (2008). DNA replication during endospore development in *Metabacterium polyspora*. *Molecular microbiology* 67: 1360–70.
- Weichart, D. ja Kell, D. (2001). Characterization of an autostimulatory substance produced by *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading, England)* 147: 1875–85.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kristiina Tüür, (sünnikuupäev: 28. mai 1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Soikeseisundist väljumine ja seda mõjutavad tegurid *Escherichia coli*'s,

mille juhendaja on Arvi Jõers,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28. mail 2013